

莽草酸脱氢酶 (Shikimate dehydrogenase, SD) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

莽草酸途径是存在于植物、真菌和微生物中的一条重要的代谢途径，莽草酸脱氢酶是莽草酸合成途径中的关键酶。

测定原理：

莽草酸脱氢酶催化莽草酸和 NADP 产生 NADPH，检测 340nm 下的吸光值增加速率来表示 SD 活性。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×2 瓶，4℃保存；

粗酶液提取：

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液)，超声波破碎细菌或细胞 (冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液)，进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、样本测定

(1) 在试剂二中加入 25mL 试剂一充分溶解混匀，置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 5min，现配现用。

(2) 取 0.05mL 样本和 0.95mL 试剂二于 1mL 比色皿中，混匀，在 340 nm 波长下立即记录 20 秒时的初始吸光度 A1 和 5 分 20 秒时的吸光度 A2，计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

SD 活性计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SD (\text{nmol} / \text{min} / \text{mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \times \text{样 Cpr}) \div T = 643 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SD (\text{nmol} / \text{min} / \text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$SD (\text{nmol} / \text{min} / 10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.286 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 1×10^{-3} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.05 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。