

NADPH-谷氨酸脱氢酶 (NADPH-GDH) 试剂盒说明书

(货号: BN72068 微板法 96 样)

一、产品简介:

谷氨酸脱氢酶广泛分布于生物体中, 在氮同化和转化成有机氮化合物的代谢中起重要作用。其辅酶是 NADPH 或 NADH, 在动植物种两种辅酶都有存在, 在酵母中主要是 NADPH-谷氨酸脱氢酶 (EC 1.4.1.4)。

本试剂盒提供一种快速灵敏的检测方法, 样品中的 NADPH-谷氨酸脱氢酶特异性作用于底物谷氨酸并产生 NADPH, 同时与显色剂反应生成黄色物质, 该物质在 450nm 处有最大吸收峰, 进而得到 NADPH-GDH 的酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	浓度为 1M
试剂二	液体 2mL×1 支	4℃保存	
试剂三	液体 1mL×1 支	4℃保存	
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、NADPH-谷氨酸脱氢酶 (NADPH-GDH) 活性测定:

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。(或按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取)

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 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); 12000rpm 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。(或按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取)

③ 液体样本: 直接检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm。

② 在 96 孔板中依次加入:

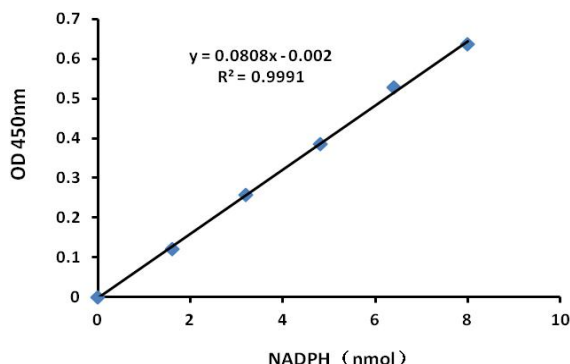
试剂名称 (μL)	测定管
提取液	80
试剂一	50
试剂二	20
样本	40
试剂三	10
混匀, 立即 450nm 下读取 A1 值, 15min 后读取 A2 值。ΔA=A2-A1。	

【注】: 若 ΔA 值过小, 可以延长反应时间 T (如由 15min 增至 30min 或 1 小时),

或增加加样体积 V_1 (如由 $40\mu\text{L}$ 增至 $80\mu\text{L}$, 则提取液相应减少), 则改变后的 T 和 V_1 需要代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线的方程: $y = 0.0808x - 0.002$, x 是 NADPH 摩尔质量 (nmol), y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NADPH-GDH}(\text{nmol/min/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.002) \div 0.0808] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 20.63 \times (\Delta A + 0.002) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NADPH-GDH}(\text{nmol/min/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.002) \div 0.0808] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 20.63 \times (\Delta A + 0.002) \div W \end{aligned}$$

4、按细菌/细胞密度计算:

单位定义: 每 1 万个细菌/细胞每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NADPH-GDH}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.002) \div 0.0808] \div (500 \times V_1 \div V) \div T \\ &= 0.04 \times (\Delta A + 0.002) \end{aligned}$$

5、液体中 NADPH-GDH 活力计算:

单位定义: 每毫升液体每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADPH-GDH}(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.002) \div 0.0808] \div V_1 \div T = 20.63 \times (\Delta A + 0.002)$$

V ---加入提取液体积, 1 mL; V_1 ---加入样本体积, 0.04 mL; T ---反应时间, 15 min;

W ---样本质量, g; 500---细菌或细胞总数, 500 万;

Cpr ---样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒;

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 ($0.5\text{nmol}/\mu\text{L}$): 向标准品 EP 管里面加入 1.2mL 蒸馏水 (母液需在两天内用且 -20°C 保存)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2. nmol/ μL 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。