

甜菜碱醛脱氢酶（BADH）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0176F 分光法 24 样）

一、产品简介：

甜菜碱醛脱氢酶（BADH）是植物、微生物等生物体中甜菜碱合成途径的关键酶，催化甜菜碱醛氧化生成甘氨酸甜菜碱。该酶在生物抵抗盐、干旱等非生物胁迫中扮演重要角色。

甜菜碱醛脱氢酶（BADH）催化甜菜碱醛和 NAD^+ 反应生成 NADH ；生成的 NADH 与显色剂反应生成黄色物质，该有色物质在 450nm 处有特征光吸收。本试剂盒通过检测该有色物质在 450 nm 处吸光度的增加速率来计算 BADH 酶活性大小。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液 A	提取液 60mL×1 瓶	4℃保存	
提取液 B	粉体 20g×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 mg×2 支	-20℃保存	使用前甩几下使试剂落入底部，再加 1.2mL 蒸馏水，混匀溶解备用。
试剂三	液体 1mL×1 支	-20℃保存	可分装冻存。
试剂四	液体 1mL×1 支	4℃保存	
标准品	粉体 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：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、水浴锅、可调式移液器、天平、研钵或匀浆器。

四、甜菜碱醛脱氢酶（BADH）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：称取约 0.2g 组织，加入 1mL 提取液 A，进行冰浴匀浆，4℃×12000 rpm，离心 10min，取全部上清液约 1mL 至一新 EP 管中，提 B 分 10 次加入（每次约 50mg），混匀后低温静置 30min（间隔 5min 晃下），4℃×12000 rpm，离心 10min，弃上清留沉淀，向沉淀中加入 0.5mL 提取液溶解，4℃×12000 rpm，离心 10min，上清置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（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；取约 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 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取全部上清液约 1mL 至一新 EP 管中，提 B 分 10 次加入（每次约 50mg），混匀后低温静置 30min（间隔 5min 晃下），4℃×12000 rpm，离心 10min，弃上清留沉淀，向沉淀中加入 0.5mL 提取液溶解，4℃×12000 rpm，离心 10min，上清置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（ 10^4 ）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。

② 试剂可于 37℃条件下水浴 5-15min。

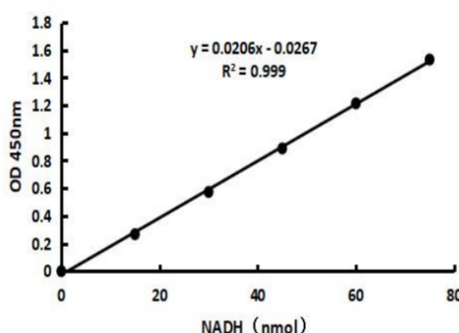
③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称(μL)	测定管
样本	150
试剂一	450
试剂二	60
试剂三	40
试剂四	30
混匀，立即于 450nm 下读取各管吸光值 A1，37℃孵育 30min 后，再读取各管吸光值 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。	

【注】若 ΔA 小于 0.01，可以增加测定管样本加样量 V1（如增至 250μL，则试剂一相应减少，以保持总体积不变），或增加样本取样量（如增加至 0.5g），或延长反应时间 T（如增至 1h 或更长）；若 A 测定大于 1.5，可对样本用蒸馏水稀释，则改变后的 W 和 V1 和稀释倍数 D 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0206x - 0.0267$ ，x 是标准品(nmol)，y 是 ΔA 。



2、按样本质量计算：

定义：每克组织每小时催化底物产生 1 nmol NADH 的量为一个酶活力单位。

$BADH(nmol/h/g \text{ 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0267) \div 0.0206] \div (W \times V1 \div V) \div T = 323.62 \times (\Delta A + 0.0267) \div W$

3、按蛋白浓度计算：

BADH：每毫克组织每小时催化底物产生 1 nmol NADH 的量为一个酶活力单位。

$酶活力(nmol/h/mg \text{ prot}) = [(\Delta A + 0.0267) \div 0.0206] \div (V1 \times Cpr) \div T = 323.62 \times (\Delta A + 0.0267) \div Cpr$

4、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10^4 个细胞每小时催化底物产生 1 nmol NADH 的量为一个酶活力单位。

$BADH(nmol/h/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0267) \div 0.0206] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.65 \times (\Delta A + 0.0267)$

V---加入提取液体积，0.5mL；

V1---加入样本体积，0.15mL；

T---反应时间，1/2 小时；

W---样本鲜重，g； 500---细胞数量，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（2μmol/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1.41mL 蒸馏水，超声完全溶解。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成五个浓度梯度的标准品：0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 μmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据 150μL 标准品+550μL 试剂一+30μL 试剂四，孵育 10min，根据结果即可制作标准曲线。