

## NADH-谷氨酸脱氢酶 (NADH-GDH) 试剂盒说明书

(货号: G0405W 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, 在氨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 NADH 或 NADPH, 在动植物种两种辅酶都有存在, 而以 NADH-谷氨酸脱氢酶 (EC 1.4.1.2) 活力为主。

本试剂盒提供一种快速灵敏的检测方法, 样品中的 NADH-谷氨酸脱氢酶特异性作用于底物谷氨酸并产生 NADH, 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 NADH-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°C 保存 |                |
| 试剂一  | 液体 5mL×1 瓶   | 4°C 保存 | 浓度为 1M         |
| 试剂二  | 液体 2mL×1 支   | 4°C 保存 |                |
| 试剂三  | 液体 1mL×1 支   | 4°C 保存 |                |
| 标准品  | 粉剂 mg×1 支    | 4°C 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、NADH-谷氨酸脱氢酶 (NADH-GDH) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

#### 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°C 离心 10min, 取上清, 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 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°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 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。若浑浊, 离心后取上清检测。

#### 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:

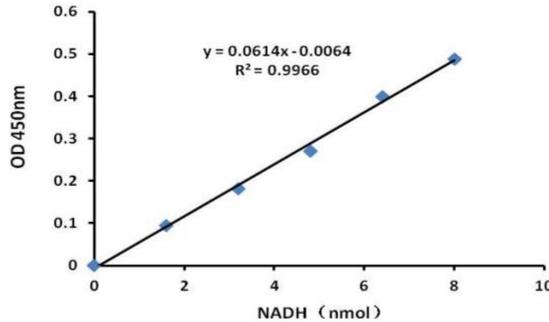
| 试剂名称 ( $\mu$ L)   | 测定管 |
|---|-----|
| 提取液   | 80  |
| 试剂一   | 50  |
| 试剂二   | 20  |
| 样本  | 40  |
| 试剂三   | 10  |
| 混匀, 立即 450nm 下读取 A1 值, 15min 后读取 A2 值。 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。 |     |

【注】: 1.若 $\Delta A$  值小于 0.01, 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 V1 (如由 40 $\mu$ L 增至 80 $\mu$ L, 则提取液相应减少), 则改变后的 T 和 V1 需要代入计算公式重新计算。

2.若立即读值导致上升趋势不稳定, 可加完所有试剂混匀后静置 5min 后再读取 A1; 也可选取一段线性上升的时间段来参与计算, 相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算:

1、标准曲线的方程:  $y = 0.0614x - 0.0064$ , x 是 NADH 摩尔质量 (nmol), y 是  $\Delta A$ 。



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 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADH-GDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0064) \div 0.0614] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ = 27.14 \times (\Delta A + 0.0064) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算:

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

$$\text{NADH-GDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0064) \div 0.0614] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 27.14 \times (\Delta A + 0.0064) \div W$$

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 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADH-GDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0064) \div 0.0614] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ = 0.0543 \times (\Delta A + 0.0064)$$

5、按液体体积计算:

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

$$\text{NADH-GDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0064) \div 0.0614] \div V1 \div T = 27.14 \times (\Delta A + 0.0064)$$

V---加入提取液体积, 1 mL; V1---加入样本体积, 0.04 mL; T---反应时间, 15min;

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 (1nmol/ $\mu$ L): 向标准品 EP 管里面加入 1.41ml 蒸馏水 (母液需在两天内用且-20 $^{\circ}$ 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/ $\mu$ L。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。