

## NADPH-谷氨酸脱氢酶 (NADPH-GDH) 试剂盒说明书

(货号: G0406F 分光法 48 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 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 70mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4°C 保存	浓度为 1M
试剂二	液体 5mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 2.2mL×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

注:粉剂量在 mg 级别,使用前用手甩几次或者进行离心,打开直接加入要求的试剂即可。

### 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)、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°C 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°C 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 可见分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 450nm,蒸馏水调零。

② 在 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

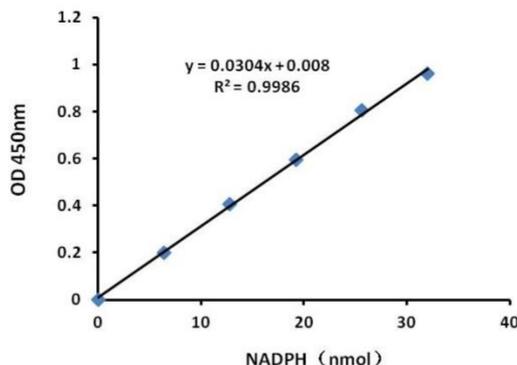
试剂名称 ( $\mu\text{L}$ )	测定管
提取液	320
试剂一	200
试剂二	80
样本	160
试剂三	40
混匀,立即 450nm 下读取 A1 值,15min 后读取 A2 值。 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。	

【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 160 $\mu$ L 增至 320 $\mu$ 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： $y = 0.0304x + 0.008$ ，x 是 NADPH 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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADPH-GDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A - 0.008) \div 0.0304] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 13.71 \times (\Delta A - 0.008) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算：

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

$$\text{NADPH-GDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.008) \div 0.0304] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 13.71 \times (\Delta A - 0.008) \div W$$

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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADPH-GDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A - 0.008) \div 0.0304] \div (500 \times V1 \div V) \div T$$

$$= 0.028 \times (\Delta A - 0.008)$$

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。

$$\text{NADPH-GDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A - 0.008) \div 0.0304] \div V1 \div T = 13.71 \times (\Delta A - 0.008)$$

V---加入提取液体积，1 mL；V1---加入样本体积，0.16mL； 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（0.5nmol/ $\mu$ 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 $^{\circ}$ C 保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5.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。