

## 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  $\text{NAD}^+$  反应生成  $\text{NADH}$ ；生成的  $\text{NADH}$  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°C 保存	
提取液 B	粉体 20g×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉体 mg×2 支	-20°C 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°C 保存	可分装冻存。
试剂四	液体 1mL×1 支	4°C 保存	
标准品	粉体 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：

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°C×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°C×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°C×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°C 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°C×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°C×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°C 条件下水浴 5-15min。

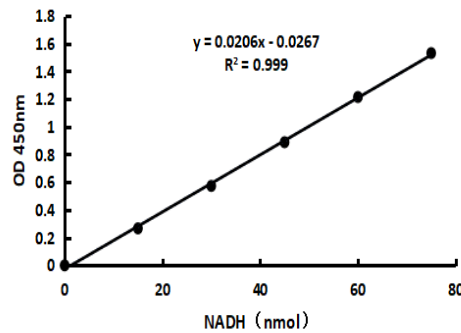
③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

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， $\Delta A=A2-A1$ 。

## 五、结果计算：

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



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。

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

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。

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

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。

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

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：0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 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。