

NADPH-谷氨酸脱氢酶（NADPH-GDH）试剂盒说明书

（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 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、

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：

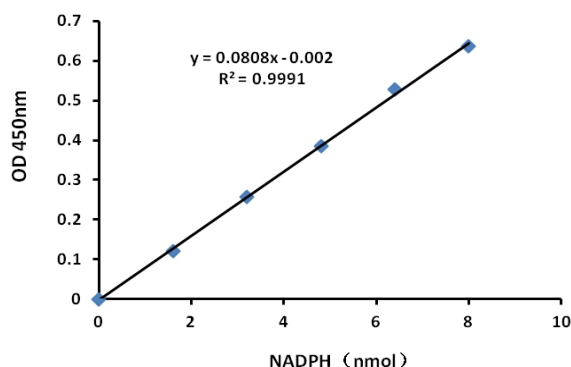
试剂名称（ μ L）	测定管
提取液	80
试剂一	50
试剂二	20
样本	40
试剂三	10
混匀，立即 450nm 下读取 A1 值，15min 后读取 A2 值。 $\Delta A=A_2-A_1$ 。	

【注】: 1.若 ΔA 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 μ L 增至 80 μ 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: $y = 0.0808x - 0.002$, 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。

$$\begin{aligned} \text{NADPH-GDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.002) \div 0.0808] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 20.63 \times (\Delta A + 0.002) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{NADPH-GDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.002) \div 0.0808] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 20.63 \times (\Delta A + 0.002) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{NADPH-GDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.002) \div 0.0808] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.04 \times (\Delta A + 0.002) \end{aligned}$$

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。

$$\text{NADPH-GDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.002) \div 0.0808] \div V1 \div T = 20.63 \times (\Delta A + 0.002)$$

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, 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 (0.5nmol/ μ 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, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2. nmol/ μ 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。