上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co.， Ltd
电话：400-666-5481　传真：021-55068248
网址：www.shyuanye.com
邮箱：3008007435@qq.com

甜菜碱醛脱氢酶（BADH)活性测定试剂盒

微板法

货号：R45169-48S

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。

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120mL×1瓶	4℃保存	
提取液B	粉体35g×1瓶	4℃保存	
试剂一	液体6mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	粉体mg×1支	4℃保存	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0.6mL×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。

所需的仪器和用品：

酶标仪、96孔板、可调式移液器、水浴锅、天平、研钵或匀浆器、蒸馏水。

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酶标仪预热30min 以上，调节波长至450nm。

②试剂可于37℃条件下水浴5-15min。

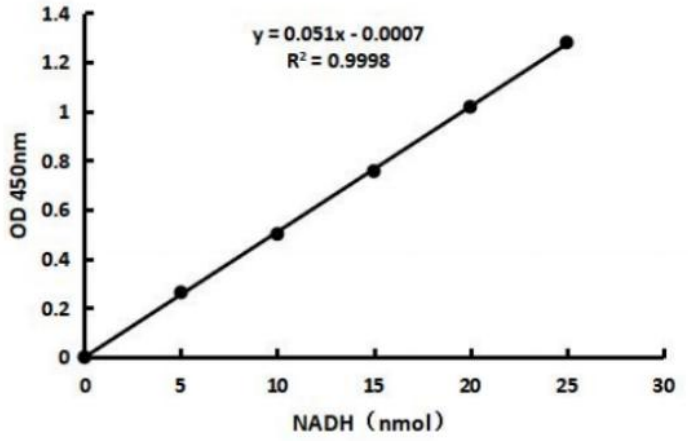
③在96孔板中依次加入：

试剂名称(μL)	测定管
样本	50
试剂一	100
试剂二	20
试剂三	20
试剂四	10
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,△A=A2-A1。	

【注】若△A小于0.01,可以增加测定管样本加样量V1(如增至100μL,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。

结果计算：

1 、标准曲线：y=0.051x-0.0007,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1nmol NADH的量为一个酶活力单位。

BADH(nmol/h/g 鲜重)=[(ΔA+0.0007)÷0.051]÷(W×V1÷V)÷T

=392.2×(ΔA+0.0007)÷W

3、 按蛋白浓度计算：

定义：每毫克组织蛋白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/mg prot)=[(ΔA+0.0007)÷0.051]÷(V1×Cpr)÷T

=392.2×(ΔA+0.0007)÷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1nmol NADH的量为一个酶活力单位。

BADH(nmol/h/10^4cell)=[[(ΔA+0.0007)÷0.051]÷(500×V1÷V)÷T

=0.784×(ΔA+0.0007)

V--- 提取液复溶体积，0.5mL;

V1--- 加入样本体积，0.05mL;

T----反应时间，1/2小时；

U-W---样本鲜重，g;

V-50---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50 μL 标准品+140μL 试剂一+10μL 试剂四，孵育10min, 根据结果即可制作标准曲线。