



甜菜碱醛脱氢酶 (BADH)活性测定试剂盒

可见分光光度法

货号: R43852-24S

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60mL×1瓶	4℃保存	
提取液B	粉体20g×1瓶	4℃保存	
试剂一	液体15mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	粉体mg×2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1mL×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:

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。

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℃条件下水浴5-15min。

③ 在 1mL 玻璃比色皿(光径1cm) 中依次加入:

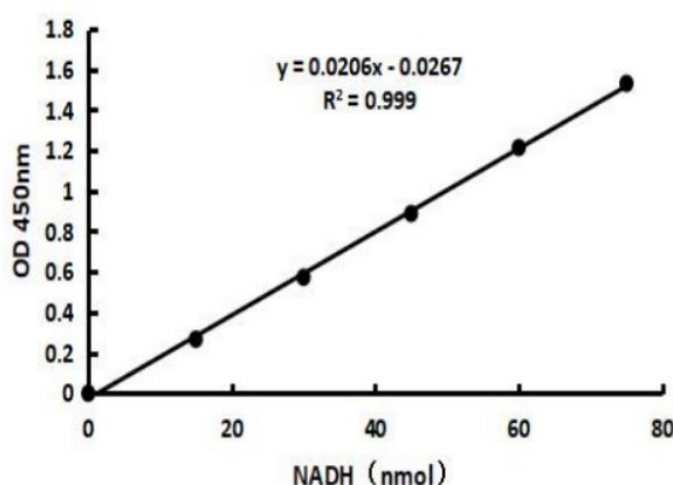
试剂名称(μL)	测定管
样本	150
试剂一	450
试剂二	60
试剂三	40
试剂四	30
混匀, 立即于450nm下读取各管吸光值A1, 37℃孵育30min后, 再读取各管吸光值A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	



【注】若 ΔA 小于0.01,可以增加测定管样本加样量 V_1 (如增至250 μL ,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 V_1 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: $y=0.0206x-0.0267$, 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。

$$\begin{aligned}\text{BADH}(\text{nmol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0267) \div 0.0206] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 323.62 \times (\Delta A + 0.0267) \div W\end{aligned}$$

3、按蛋白浓度计算:

BADH: 每毫克组织每小时催化底物产生1nmol NADH 的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{酶活力}(\text{nmol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0267) \div 0.0206] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 323.62 \times (\Delta A + 0.0267) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

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。

$$\text{BADH}(\text{nmol/h}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0267) \div 0.0206] \div (500 \times V_1 \div V) \div T$$



$$=0.65 \times (\Delta A + 0.0007)$$

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;

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(2 μ mol/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 μ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

3.依据150 μ L 标准品+550 μ L 试剂一+30 μ L 试剂四, 孵育10min, 根据结果即可制作标准曲线。