



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

NADPH-谷氨酸脱氢酶(NADPH-GDH)试剂盒

可见分光光度法

货号: R43900-48S

产品简介:

谷氨酸脱氢酶广泛分布于生物体中, 在氮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NADP H-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。

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℃保存	
试剂一	液体10mL×1瓶	4℃保存	浓度为1M
试剂二	液体5mL×1支	4℃保存	
试剂三	液体2.2mL×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

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。

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。

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:

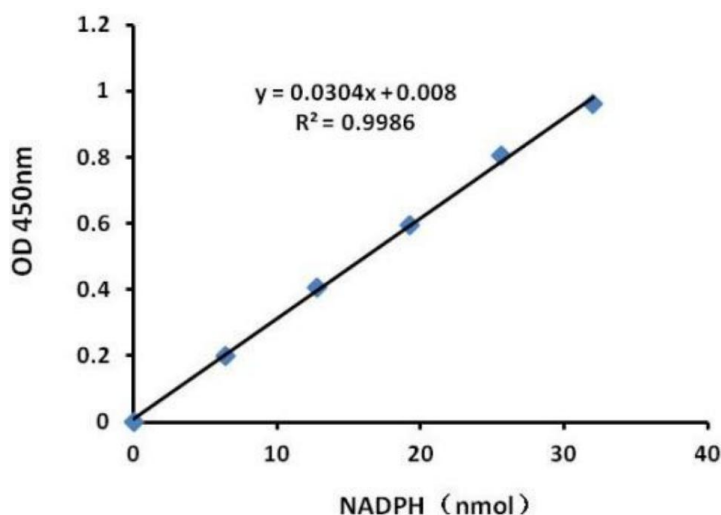
试剂名称(μL)	测定管
提取液	320
试剂一	200
试剂二	80
样本	160
试剂三	40
混匀, 立即450nm下读取A1值, 15min后读取A2值。 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。	

【注】:1.若 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160μL增至320μL, 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。

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 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1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{NADPH-GDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A - 0.008) \div 0.0304] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 13.71 \times (\Delta A - 0.008) \div Cpr\end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算:

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

$$\begin{aligned}\text{NADPH-GDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.008) \div 0.0304] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 13.71 \times (\Delta A - 0.008) \div W\end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned}\text{NADPH-GDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) &= [(\Delta A - 0.008) \div 0.0304] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.028 \times (\Delta A - 0.008)\end{aligned}$$

5、液体中NADPH-GDH 活力计算:

单位定义: 每毫升液体每分钟生成1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

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



V---加入提取液体积, 1mL;

V1--- 加入样本体积, 0.16mL;

T---反应时间, 15min;

W--- 样本质量, g;

50---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/μL): 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℃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/μL 。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。

源叶