

NADH-谷氨酸脱氢酶（NADH-GDH）试剂盒说明书

（货号：ADS-W-N004-96 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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 NADH 或 NADPH，在动植物种两种辅酶都有存在，而以 NADH-谷氨酸脱氢酶（EC 1.4.1.2）活力为主。

本试剂盒提供一种快速灵敏的检测方法，样品中的 NADH-谷氨酸脱氢酶特异性作用于底物谷氨酸并产生 NADH，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 NADH-GDH 的酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 6mL×1 瓶	4℃保存	1. 浓度为 1M； 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 3mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 1.5mL×1 支	4℃避光保存	
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

- 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。

【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 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。

【注】：若增加样本量，按照细菌或细胞数量（10⁴ 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。若浑浊，离心后取上清检测。

2、检测步骤：

- 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：

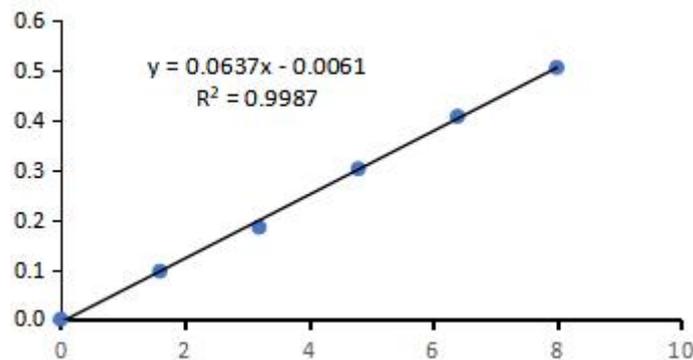
试剂组分（μL）	测定管
提取液	80
试剂一	50
试剂二	20

样本	40
试剂三	10
混匀, 立即 450nm 下读取 A1 值, 15min 后读取 A2 值。ΔA=A2-A1。	

- 【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 40μL 增至 80μL, 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: $y = 0.0637x - 0.0061$, x 是 NADH 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 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NADH-GDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0061) \div 0.0637] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 26.2 \times (\Delta A + 0.0061) \div Cpr \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算:

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

$$\begin{aligned} \text{NADH-GDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0061) \div 0.0637] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 26.2 \times (\Delta A + 0.0061) \div W \end{aligned}$$

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 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NADH-GDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0061) \div 0.0637] \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.0523 \times (\Delta A + 0.0061) \end{aligned}$$

5、按液体体积计算:

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

$$\text{NADH-GDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0061) \div 0.0637] \div V1 \div T = 26.2 \times (\Delta A + 0.0061)$$

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, 15min;

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 向标准品 EP 管里面加入 1.41ml 蒸馏水 (母液需在两天内用且 -20°C 保存), 标准品母液浓度为 1nmol/μL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品, 例如: 0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16,

0.2nmol/μL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 200uL，加入 800uL 蒸馏水，混匀得到 0.2nmol/μL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 nmol/μL	0	0.04	0.08	0.12	0.16	0.2
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
提取液	80	80
试剂一	50	50
试剂二	20	20
标品	40	
蒸馏水		40
试剂三	10	10
混匀，立即 450nm 下读取 A 值， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		