NADH-谷氨酸脱氢酶（NADH-GDH）试剂盒说明书

(分光法 48 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 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瓶	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。

三、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。

四、NADH-谷氨酸脱氢酶（NADH-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，取上清液，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：

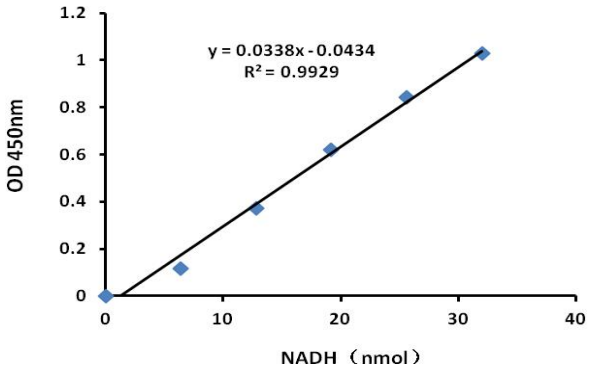
试剂名称（μL）	测定管
提取液	320
试剂一	200
试剂二	80
样本	160
试剂三	40
混匀，立即 450nm 下读取 A1 值，15min 后读取 A2 值。ΔA=A 2-A1。	

【注】：若ΔA 值过小，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。

五、结果计算：

1、标准曲线的方程：y =0.0338x - 0.0434，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。

NADH-GDH(nmol/min/mg prot)=[(ΔA+0.0434)÷0.0338]÷(V1×Cpr)÷T

=12.33×(ΔA+0.0434)÷Cpr

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。

NADH-GDH(nmol/min/g 鲜重)=[(ΔA+0.0434)÷0.0338]÷(W×V1÷V)÷T

=12.33×(ΔA+0.0434)÷W

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。

NADH-GDH(nmol/min/10^4 cell)=[(ΔA+0.0434)÷0.0338]÷(500×V1÷V) ÷T

=0.025×(ΔA+0.0434)

5、液体中 NADH-GDH 活力的计算：

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。

NADH-GDH(nmol/min/mL)=[(ΔA+0.0434)÷0.0338]÷V1÷T=12.33×(ΔA+0.0434)

V---加入提取液体积，1 mL；V1---加入样本体积，0.16mL； 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/μL）：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℃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/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。