

谷氨酸脱氢酶测试盒说明书(精简版)

(货号: A125-1-1 Glutamate dehydrogenase, GDH 分光光度法 50T/48 样)

一、测定原理:

谷氨酸脱氢酶 (Glutamate dehydrogenase, GDH) 催化 NH_4^+ 、 α -酮戊二酸和 NADH, 生成谷氨酸和 NAD^+ , 引起 340nm 吸光度值下降; 通过测定 340nm 处吸光度的下降速率, 计算 GDH 活性。

二、测定意义:

GDH (EC1.4.1.2) 广泛分布于植物中, 和谷氨酸合成酶 (GOGAT) 共同参与谷氨酸的合成, 在氨同化和转化成有机氮化合物的代谢中起重要作用。

三、自备仪器或用品:

紫外分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、蒸馏水、冰。

四、试剂盒组成:

| | 规格 | 保存 |
|-----|--------------|-------|
| 提取液 | 液体, 60mL×1 瓶 | 4℃ 保存 |
| 试剂一 | 液体, 60mL×1 瓶 | 4℃ 保存 |
| 试剂二 | 粉剂×2 支 | 4℃ 保存 |

五、粗酶液提取:

- 1、细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积为 500~1000:1 的比例 (建议 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); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 2、组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1:5~10 的比例 (建议取 0.1g 组织, 加 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆; 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 3、血清 (浆): 直接取样检测

六、操作步骤:

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、样本测定:
 - (1) 工作液配制: 将试剂二中加入试剂一 25mL 混合溶解, 置于恒温水浴锅预温 (哺乳动物 37℃; 非哺乳动物 25℃) 5min, 现用现配 (配好后 12h 内用完)。
 - (2) 测定: 取 0.95mL 工作液和 0.05mL 待测粗酶液于试管中, 混匀并立即转入 1mL 比色皿, 于波长 340nm 测得 20 秒时吸光度值 A_1 和 5 分钟 20 秒时的吸光度值 A_2 , 计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。(将样本加入工作液中即进行计时)

七、单位定义与计算:

- (1) 按蛋白浓度计算:

单位定义: 每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GDH 活力 (U/mgprot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{643 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

- (2) 按样本鲜重计算:

单位定义: 每 g 组织每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GDH 活力 (U/g 鲜重)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{643 \times \Delta A}{W}$$

- (3) 按细菌或细胞密度计算:

单位定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GDH 活力 (U/10}^4 \text{ 细胞)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times 500 \times T} = 1.286 \times \Delta A$$

- (4) 血清 (浆) 中 GDH 计算

$$\text{GDH 活力 (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times T} = 643 \times \Delta A$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 1×10^{-3} L;

ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm;

d : 比色皿光径, 1cm;

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05mL;

$V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL;

T : 反应时间, 5min;

Cpr : 样本蛋白浓度, mgprot/mL;

W : 样本质量, g;

500 : 细胞或细菌总数, 500 万。