

谷氨酸脱氢酶(GDH)检测试剂盒说明书

(货号: ADS-F-N030 分光法 48 样)

有效期: 3 个月

测定意义:

GDH (EC 1.4.1.2) 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。

测定原理:

GDH 催化 NH_4^+ 、 α -酮戊二酸和 NADH, 生成谷氨酸和 NAD^+ , 引起 340nm 吸光度下降。通过测定 340nm 吸光度的下降速率, 计算 GDH 活性。

需自备的仪器和用品:

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

试剂组成和配制:

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×1 支, 4℃ 保存;

试剂三: 粉剂×1 支, 4℃ 保存;

试剂四: 粉剂×1 支, -20℃ 保存。

粗酶液提取:

- 1、收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (功率 20%, 超声 3 秒, 间隔 10 秒, 重复 30 次); 8000g 4℃ 离心 10 分钟, 取上清, 置冰上待测。
- 2、称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10 分钟, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

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) 工作液的配制: 临用前将试剂二、三、四转移到试剂一中混合溶解, 置于 25℃ 水浴 5min;
- (2) 取 1mL 工作液和 0.05mL 样本于 1mL 比色皿中, 混匀, 加样本的同时开始计时, 在 340 nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A_1 和 5 分 20 秒时的吸光度 A_2 , 计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

GDH 活性计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

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

$$\text{GDH (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 675 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算:

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

$$\text{GDH (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 675 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

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

$$\text{GDH (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 1.35 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 1.05×10^{-3} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 mol/L/cm; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 5 min; Cpr : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样品质量, g; 500: 细菌或细胞总

数，500万。

艾迪生