

谷氨酸脱氢酶(GDH)活性检测试剂盒说明书

Glutamic Acid Dehydrogenase Assay Kit

微量法

货号: AK079

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES11	100ml×1 瓶	4℃保存;
AK079-A	20mL×1 瓶	4℃保存;
AK079-B	粉剂×1 支	-20℃保存;
工作液配制: 在 AK079-B 中加入 19mL AK079-A 充分溶解混匀, 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 5min, 现用现配。		

简介:

意义: 谷氨酸 (Glu) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 不仅是组成蛋白质的 20 种氨基酸之一, 还可以通过转氨基作用参与多种氨基酸合成, 是生物体内主要氨基来源之一。谷氨酸脱氢酶 (GDH) 和谷氨酸合成酶 (GOGAT) 共同参与谷氨酸的合成, 在氨同化和转化有机氮化合物的代谢中起重要作用。

原理: 谷氨酸脱氢酶能够催化 α -酮戊二酸、NADH 和 NH_4^+ 生成谷氨酸和 NAD^+ , NADH 在 340 nm 处具有特征吸收峰, 通过测定 NADH 分解速率即可表征谷氨酸脱氢酶的活性。

自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、水浴锅、研钵/匀浆器、台式离心机、可调式移液枪、冰和双蒸水。

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; 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液 ES11, 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: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液 ES11, 进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
3. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 样本测定:
在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μ L 样本和 190 μ L 工作液 (需要现配), 混匀, 立即记录 340nm 处 20 秒时的吸光值 A1 和 5 分 20 秒后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

GDH 活性计算:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 血清 (浆) 中 GDH 活力的计算:
单位的定义: 每毫升血清 (浆) 每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。
$$\text{GDH (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 643 \times \Delta A$$
2. 组织、细菌或细胞中 GDH 活力的计算:
(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。

$$\text{GDH (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 643 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

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

(3) 按细菌或细胞数量计算：

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。

$$\text{GDH (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.286 \times \Delta A$$

注：V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 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：样本质量(g)；500：细菌或细胞总数，500 万。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 血清（浆）中 GDH 活力的计算：

单位的定义：每毫升血清（浆）每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GDH (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1286 \times \Delta A$$

2. 组织、细菌或细胞中 GDH 活力的计算：

(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。

$$\text{GDH (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1286 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{GDH (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1286 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{GDH (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2.572 \times \Delta A$$

注：V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 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：样本质量(g)；500：细菌或细胞总数，500 万。

注意事项：

1. 测定过程中样本应保持冰上放置，以免变性和失活；
2. 若 ΔA 大于 0.5，建议将粗酶液适当稀释后再进行测定，计算时相应修改；
3. 提取液中含有约 1 mg/mL 的蛋白，测定样本蛋白浓度时需要减去提取液自身的蛋白含量。