

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0646

Size: 50T/48S

谷氨酸脱氢酶 (GDH) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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, 在氮同化和转化成有机氮化合物的代谢中起重要作用。

二、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。

三、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。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C 保存	

五、操作步骤：

● 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°C 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°C 离心 10 分钟，取上清，置冰上待测。

● 测定步骤：

1、紫外分光光度计预热 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：临用前将试剂一加入试剂二中混合溶解，置于 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 5min；

(2) 取 1mL 工作液和 0.05mL 样本于光径为 1cm 的 1mL 石英比色皿中，混匀，加样本的同时开始计时，在 340nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1 和 5 分 20 秒时的吸光度 A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。
注：当 ΔA 大于 0.5 时，将样本进行稀释后测量。

六、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 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本鲜重计算：

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

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

(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 L / mol / 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； C_{pr} ：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。