

谷氨酸脱氢酶(GDH)活性检测试剂盒说明书

Glutamic Acid Dehydrogenase Assay Kit

紫外分光光度法

货号: AK078

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES11	60mL×1 瓶	4℃保存;
AK078-A	60mL×1 瓶	4℃保存;
AK078-B	粉剂×1 支	4℃保存;
AK078-C	粉剂×1 支	4℃保存;
AK078-D	粉剂×1 支	-20℃保存;
工作液配制: AK078-B、C、D 转移到试剂 AK078-A 中混合溶解, 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 5min; 现配现用;		

简介:

意义: 谷氨酸脱氢酶 (Glutamic Acid Dehydrogenase, GLDH 或 GDH) 是线粒体酶, 是催化谷氨酸氧化脱氨或其逆反应的一类不需氧脱氢酶。生物体内广泛存在, 主要存在于肝脏、心肌及肾脏, 少量存在于脑、骨骼肌及白细胞中。是体内催化 L-氨基酸脱去氨基反应中能力最强的一种酶, 在氨基酸的联合脱氨作用中起重要作用。在不同的生物细胞或细胞器内, 辅酶可能不同, 或 NAD⁺, 或 NADP⁺。是一种变构酶, 活性受细胞内 ATP、ADP、GTP、GDP、NADH+H⁺、NAD⁺等所调节。在异养真核生物内, 能利用 α-酮戊二酸、氨和 NADPH+H⁺催化合成谷氨酸。

原理: GDH 催化 NH₄⁺、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。

自备用品:

紫外分光光度计、1ml 石英比色皿、水浴锅、可调式移液枪、离心机、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. 紫外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,
取 50ul 样本和 1mL 工作液 (需要现配) 于 1mL 比色皿中, 混匀, 加工作液的同时开始计时, 在 340 nm 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 ΔA=A1-A2。

GDH 活性计算:

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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 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; 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. 当 ΔA 大于 0.5 时, 将样本进行稀释后测量。
2. 测定过程中样本应保持冰上放置, 以免变性和失活;
3. 由于提取液中含有一定浓度的蛋白(约 1mg/mL), 所以在测定样本蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量。