

## 谷氨酸脱氢酶 (Glutamate dehydrogenase, GDH) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 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  $\text{NH}_4^+$ 、 $\alpha$ -酮戊二酸和 NADH, 生成谷氨酸和  $\text{NAD}^+$ , 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。

### 组成:

产品名称	NM 003-50T/48S	Storage
提取液: 液体	60ml	4°C
试剂一: 液体	60ml	4°C
试剂二: 粉剂	2 瓶	4°C
说明书	一份	

### 自备仪器和用品:

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。

### 粗酶液提取:

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 (ml) 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°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (ml) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1ml 提取液), 进行冰浴匀浆。8000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

血清 (浆) 样品: 直接检测。

### 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) 在试剂二中加入 25ml 试剂一充分溶解混匀，置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）水浴 5min；  
**现配现用（配好后 12h 内用完）；**

(2) 取 0.05ml 样本和 0.95ml 工作液于 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 $\Delta A=A1-A2$ 。

### 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。

$$\text{GDH (nmol/min/ml)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 643 \times \Delta A$$

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。

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

(2) 按样本鲜重计算：

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

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

(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。

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

V 反总：反应体系总体积， $1 \times 10^{-3}$  L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；

V 样：加入样本体积，0.05 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。

