

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

微量法 100 管/96 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	NM004-100T/96S	Storage
提取液：液体	100ml	4°C
试剂一：液体	20ml	4°C
试剂二：粉剂	2 瓶	4°C
说明书	一份	

试剂三：粉剂×1 瓶，-20 °C保存，用时加入 4ml 蒸馏水，混匀，用不完的试剂 4°C保存一周；

试剂四：粉剂×1 瓶，4 °C保存，用时加入 4ml 蒸馏水，混匀，用不完的试剂 4°C保存一周；

### 自备仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、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。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司，保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线：0518-81263339

官网：<http://www.bio149.com>

## 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

(1) 在试剂二中加入 10ml 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) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 $\mu$ l 样本和 190 $\mu$ l 试剂二, 混匀, 立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 5min20s 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。

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

(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。

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

(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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 2 $\times 10^{-4}$  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, 0.01 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。

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

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。

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

(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。

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

(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。



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

V 反总: 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  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。

