

γ-谷氨酸激酶 (γ-GK) 酶活测定试剂盒

分光法 24 样

产品简介

γ-谷氨酸激酶(γ-GK, EC 2.7.2.11)是脯氨酸生物合成途径中的关键酶之一。催化由谷氨酸生成脯氨酸途径的第一步反应。本试剂盒利用γ-GK 催化谷氨酸磷酸化, 进一步转化为γ-谷氨酰基异羟肟酸, 在酸性条件下与 Fe³⁺形成 Hydroxamate-Fe³⁺复合物, 通过检测该复合物在 535 nm 波长处的 OD 值, 进而得出γ-GK 酶活力大小。该酶催化的反应方程式: ATP+L-glutamate=ADP+L-glutamate 5-phosphate。

试剂盒组成和配制

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 8mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下, 使粉体落到底部, 再加入 10mL 蒸馏水溶解备用
试剂三	液体 8mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉体 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下, 使粉体落到底部, 再加入 1.8mL 蒸馏水溶解备用。
试剂五	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	

所需的仪器和用品

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、水浴锅、离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

γ -谷氨酸激酶 (γ -GK) 活性测定

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样本情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 冰浴匀浆, 12000rpm, 4°C离心 10min, 取上清液待用。

[注]: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 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 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次);

12000rpm 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

[注]: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 澄清的液体样本直接检测, 若浑浊则离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 535nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温。

③ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	150
试剂一	150
试剂二	150
试剂三	150
试剂四	
混匀，37℃水浴 60min	
试剂五	300
混匀，反应 2min 后，8000rpm，4℃离心 10min，取全部上清液于 1mL 玻璃比色皿中，535nm 处分别读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ （每个测定管须设一个对应的对照管）。	

[注]：若 ΔA 的值在零附近徘徊，则可加大样本量 V1（如增至 200μL，则试剂一相应减少），

则改变后的加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

结果计算

1、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白在每小时内催化产生 1 nmol 谷氨酰羟肟酯所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol/h/mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 240 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按样本鲜重计算：

单位定义: 每克组织在每小时内催化产生 1 nmol 谷氨酰羟肟酯所需的酶量定义为一个酶活力单位。

3、按细菌/真菌数量计算:

单位定义: 每 10^4 个细胞在每小时内催化产生 1 nmol 谷氨酰羟肟酯所需的酶量定义为一个酶活单位 (U)。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^4] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.48 \times \Delta A$$

4、液体中酶活力计算:

单位定义: 每毫升液体在每小时内催化产生 1 nmol 谷氨酰羟肟酯所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10] \div V1 \div T = 240 \times \Delta A$$

V---提取液体积, 1mL; V1---加入反应体系中样本体积, 0.15mL;

V2---反应体系总体积: 9×10^{-4} L; d---光径, 1cm;

T---反应时间, 60min=1h; W---样本质量, g;

ϵ ---摩尔消光系数, 2.5×10^4 L/mol/cm;

Cpr----样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。