

γ-谷氨酸激酶 (γ-GK) 酶活测定试剂盒说明书

(货号: G1105W 分光法 24 样)

一、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。

二、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	

三、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。

四、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℃ 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℃ 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(10⁴):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 (μL)	测定管	对照管
样本	150	150
试剂一	150	120

试剂二	150	150
试剂三	150	150
试剂四		30
混匀, 37℃水浴 60min		
试剂五	300	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, $\Delta A = A$ 测定管 - A 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 200 μ L, 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。

五、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。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 240 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞数量计算:

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)。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol/min} / 10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.48 \times \Delta A$$

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。

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

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。