

## 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。

### 需自备的仪器和用品：

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。

### 试剂组成和配制：

提取液：液体 60mL×1 瓶, 4℃ 保存；

试剂一：液体 60mL×1 瓶, 4℃ 保存；

试剂二：粉剂×2 瓶, 4℃ 保存；

### 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℃ 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℃ 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℃ (哺乳动物) 或 25℃ (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  $A_1$  和 5 分 20 秒时的吸光度  $A_2$ , 计算  $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

### 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。

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

##### (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。

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

$V_{\text{反总}}$ : 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;  $V_{\text{样}}$ : 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;  $\text{Cpr}$ : 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。