

γ-谷氨酸激酶(γ-GK)试剂盒

(微板法 48 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,进一步与转化为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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下,使粉体落到底部, 再加入 6mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体 5mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	粉体 mg×1 支	4°C保存	临用前甩几下,使粉体落到底部, 再加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂五	液体 10mL×1 瓶	4°C保存	

所需的仪器和用品：

酶标仪、96孔板、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，了解本批样品情况，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 (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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 540nm。

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	对照管
样本	50	50
试剂一	50	40
试剂二	50	50
试剂三	50	50
试剂四		10
混匀, 37°C水浴 60min		
试剂五	100	100
混匀, 反应 2min 后, 8000rpm, 4°C离心 10min, 取 200μL 上清液于 96 孔板中, 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 80μL, 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。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol/h/mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 480 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 480 \times \Delta A \div W$$

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)。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.96 \times \Delta A$$

4、液体中酶活力的计算：

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。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 480 \times \Delta A$$

V---提取液体积, 1mL; V1---加入反应体系中样本体积, 0.05mL;

V2---反应体系总体积: 3×10^{-4} L; d---96 孔板光径, 0.5cm;

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。