

## γ-谷氨酸激酶(γ-GK)酶活测定试剂盒

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 Fe<sup>3+</sup>形成 Hydroxamate-Fe<sup>3+</sup>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:  $ATP+L\text{-glutamate}=ADP+L\text{-glutamate 5-phosphate}$ 。

### 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℃保存	
试剂一	液体 5mL×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 6mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体 5mL×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 1.1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂五	液体 10mL×1 瓶	4℃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°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 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， $\Delta A=A$ 测定管-A 对照管（每个测定管须设一个对应的对照管）。		

**【注】**：若 $\Delta A$  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： $3 \times 10^{-4}$  L； d---96 孔板光径，0.5cm；

T---反应时间，60min=1h； W---样本质量，g；

$\epsilon$ ---摩尔消光系数， $2.5 \times 10^4$  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。