

γ -Glutamate kinase (γ -GK) Activity Assay Kit

γ -谷氨酸激酶 (γ -GK) 酶活测定试剂盒说明书

货号: BN72134 | 方法: 微板法 | 规格: 48 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, 进一步与转化为 γ -谷氨酰基异羟肟酸, 在酸性条件下与 Fe^{3+} 形成 Hydroxamate- Fe^{3+} 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: $\text{ATP} + \text{L-glutamate} = \text{ADP} + \text{L-glutamate 5-phosphate}$ 。

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 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	

三、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。

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°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 (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)。		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol/h/mg prot}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 480 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 480 \times \Delta A \div W$$

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)。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol/min} / 10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.96 \times \Delta A$$

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。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_1 \div T = 480 \times \Delta A$$

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。