

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: BN72135 | 方法: 可见分光法 | 规格: 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 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 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 8mL×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 10mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体 8mL×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 1.8mL 蒸馏水溶解备用。
试剂五	液体 15mL×1 瓶	4°C 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°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 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°C水浴 60min		
试剂五	300	300
混匀, 反应 2min 后, 8000rpm, 4°C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, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ (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。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol/h/mg prot}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T = 240 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 240 \times \Delta A \div W$$

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)。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.48 \times \Delta A$$

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。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_1 \div T = 240 \times \Delta A$$

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。