

**谷氨酸脱氢酶（Glutamate dehydrogenase, GDH）试剂盒说明书****分光光度法 50 管/48 样**

**注 意：** 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 A1 和 5 分 20 秒时的吸光度 A2，计算  $\Delta A = A1 - A2$ 。

**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。

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

(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 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 样：加入样本体积，0.05 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；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。