γ-谷氨酸激酶（γ-GK）酶活测定试剂盒说明书

（货号：G1105W 微板法 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：ATP+L-glutamate=ADP+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℃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	

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℃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（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℃水浴 60min		
试剂五	100	100
混匀，反应 2min 后，8000rpm，4℃离心 10min，取 200μL 上清液于 96 孔板中，535nm 处分别读取吸光值 A，△A=A 测定管-A 对照管（每个测定管须设一个对应的对照管）。		

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。

γ-GK 活性(nmol/h/mg prot)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(V1×Cpr)÷T=480×ΔA÷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。

γ-GK 活性(nmol/min/g 鲜重)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(W×V1÷V)÷T=480×ΔA÷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）。

γ-GK 活性(nmoL/min /10^4 cell)= [ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(500×V1÷V)÷T=0.96×△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。

γ-GK 活性(nmol/min/mL)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷V1÷T=480×ΔA

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，2.5×104 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。