

γ-谷氨酸激酶（γ-GK）酶活测定试剂盒说明书

（货号：BP10439W 微板法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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 Fe³⁺形成 Hydroxamate-Fe³⁺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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 6mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 5mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂四	粉体 1 支	4℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

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、样本提取：

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（10⁴）：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、检测步骤：

- 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， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ （每个测定管须设一个对应的对照管）。		

【注】若 ΔA 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。

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。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol/h/mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 480 \times \Delta A \div Cpr$$

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)。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.96 \times \Delta A$$

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。

$$\gamma\text{-GK 活性}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 480 \times \Delta A$$

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： 3×10^{-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。