

谷氨酸脱氢酶活性检测试剂盒 (100T)

说 明

谷氨酸脱氢酶 (GDH) 是一种线粒体酶, 催化谷氨酸可逆性氧化脱氨生成 α -酮戊二酸, 作为合成代谢和分解代谢途径之间的关键链接。在哺乳动物中, GDH 受变构调节, 在肝脏、肾脏、大脑和胰腺中具有较高的活性。血清中的 GDH 活性可用于区分肝脏炎症所致的肝脏疾病 (未显示血清 GDH 活性升高) 和导致肝细胞坏死的疾病 (导致血清 GDH 升高)。本公司的 GDH 检测是基于四唑盐 MTT 在 NADH 偶联的酶促反应中被还原成 MTT 的还原形式, 在 565nm 处显示出吸收最大值。在 565nm 处的吸光度与酶的活性成正比。检测范围: 30 分钟反应, 0.5 至 80 U/L; 120 分钟反应的检测限为 0.2 U/L。

应 用

检测各种生物样品 (如血浆、血清、尿液、组织和培养基) 中的 GLDH 活性。

试剂盒组成与保存

缓冲液:	10 mL	心肌黄酶:	120 μ L
NAD溶液:	1 mL	MTT 溶液:	1.5 mL
底 物:	1 mL	校准液:	1.5mL

储存: 所有试剂均在 -20°C 保存。

检测步骤

这种测定是以动力学反应为基础的。为确保相同的孵化时间, 向样品中加入反应试剂的速度要快, 搅拌时间要短但要彻底。建议使用多通道移液器。检测可以在任何需要的温度下进行 (如 25°C 或 37°C)。

一、样本制备:

血清和血浆直接进行检测。

组织: 在解剖前, 用磷酸盐缓冲盐水 (pH7.4) 冲洗组织以去除血液。在含有 50mM 磷酸二氢钾 (pH7.5) 的约 200 μ L 缓冲液中匀浆组织 (50mg)。在 4°C 下以 10,000 x g 离心 15 分钟。取上清液进行检测。

细胞裂解液: 在 4°C 下以 2,000 x g 离心 5 分钟, 收集细胞, 对于粘附细胞, 不要用蛋白水解酶来收获细胞, 而是用刮除器。在含有 50mM 磷酸二氢钾 (pH7.5) 的适当体积的冷缓冲液中匀浆或超声处理细胞。在 4°C 下以 10,000 x g 离心 15 分钟。取上清液进行检测。

所有样品可在 -20°C 至 -80°C 下储存至少一个月。

二、试剂准备:

将试剂放置到所需的反应温度 (如 25°C 或 37°C)。在使用前对试剂进行简单的离心。

反应试剂的制备方法是: 为每个 96 孔试验混合 10 μ L 底物、14 μ L MTT 溶液、9 μ L NAD 溶液、1 μ L 心肌黄酶和 50 μ L 缓冲液。空白反应试剂的制备方法是: 为每一个 96 孔的试验混合 14 μ L MTT 溶液, 9 μ L NAD 溶液, 1 μ L 心肌黄酶和 60 μ L 缓冲液 (即无底物)。

三、反 应:

1. 将 100 μ L 水 ($\text{OD}_{\text{H}_2\text{O}}$) 和 100 μ L 校准液 (OD_{CAL}) 转移到透明平底 96 孔板的孔中。
2. 将 20 μ L 样品转移到 2 个独立的孔中。在一个样品孔中加入 80 μ L 反应试剂, 在另一个样品孔中加入 80 μ L 空白反应试剂。短暂敲击孔板以混合。
3. 在酶标仪上读取 $\text{OD}_{565\text{nm}}$ (OD_0), 并在 30 分钟后再次读取 (OD_{30})。

四、计算

用 OD_{30} 减去每个样品和样品空白孔的 OD_0 ，分别计算出 ΔOD_S 和 ΔOD_B 值。然后，ADH 活性可按以下公式计算：

$$\begin{aligned} \text{ADH Activity} &= \frac{\Delta OD_S - \Delta OD_B}{\epsilon_{\text{mtt}} \cdot l} \times \frac{\text{Reaction Vol } (\mu\text{L})}{t \text{ (min)} \cdot \text{Sample Vol } (\mu\text{L})} \times n \\ &= \frac{273}{t \text{ (min)}} \times \frac{\Delta OD_S - \Delta OD_B}{OD_{\text{CAL}} - OD_{\text{H}_2\text{O}}} \times n \quad (\text{U/L}) \end{aligned}$$

其中 ϵ_{mtt} 是还原MTT的摩尔吸收系数。 l 是光的路径长度，由校准器计算得出。 OD_{CAL} 和 $OD_{\text{H}_2\text{O}}$ 是校准液和水的 $OD_{565\text{nm}}$ (OD_0) 值。 t 是反应时间（建议时间为30分钟）。反应体积和样品体积分别为 $100\mu\text{L}$ 和 $20\mu\text{L}$ 。 n 是稀释系数。

单位定义：单位定义：1个单位（U）的GLDH在pH值为8.2时，每分钟将催化1摩尔谷氨酸转化为酮戊二酸。

备注：如果样品GLDH活性超过80 U/L，可以使用较短的反应时间，或者将样品在水中稀释并重复检测。对于GLDH活性 < 1 U/L 的样品，孵化时间可延长至2小时。

注意事项：本产品仅供研究用，使用过程中应严格遵循实验安全措施。