

谷氨酸脱氢酶(GDH)活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PYHB5-C24	谷氨酸脱氢酶（GDH）活性检测试剂 盒说明书	24T	常量法
PYHB5-C48		48T	

一、 测定意义：

植物体内谷氨酸脱氢酶（GDH）的测定对于解析氮代谢调控机制及植物逆境响应研究具有重要意义。GDH 通过催化谷氨酸与 α -酮戊二酸的可逆转化，参与氮同化与再循环过程，尤其在碳氮平衡、氨解毒及能量代谢中发挥关键作用。其活性变化可反映植物对氮素利用效率的适应性。可为评估植物抗逆能力、优化氮肥管理及选育高效氮利用品种提供重要生化指标。

二、 测定原理：

谷氨酸脱氢酶催化 NH_4^+ 、 α -酮戊二酸和 NADH，生成谷氨酸和 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。

三、 试剂组成：

试剂名称	试剂装量(24T)	试剂装量(48T)	保存条件
提取液	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂 ×1 支	粉剂 ×2 支	2-8℃保存
试剂三	粉剂 ×1 支	粉剂 ×2 支	2-8℃保存
试剂四	粉剂 ×1 支	粉剂 ×2 支	-20℃保存

工作液的配置：取试剂二、试剂三、试剂四粉剂各一支加入 30mL 试剂一中充分溶解，现用现配，可分装-20°保存一周，避免反复冻融。

四、 操作步骤：

样本前处理

植物组织提取液的制备：取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，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），旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃离心 10min，取上清液置冰上待测。

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. 测定前将工作液平衡至常温；
3. 操作表：

	测定管
样品（ μL ）	100
双蒸水（ μL ）	-
工作液（ μL ）	900

迅速混匀，25°下，在波长 340m 处 读取 30s 时吸光值 A1 和 5min30s 时的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$ 。

四、谷氨酸脱氢酶活性计算：

(1) 按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织每分钟消耗 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

$$\text{GDH (U/g)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 321.54 \times \Delta A \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

$$\text{GDH (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 321.54 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

V 反总: 反应体系总体积, 1×10^{-3} L;

ϵ : NADH, 6.22×10^3 L/mol/cm;

d: 比色皿光径, 1cm;

V 样: 加入样本体积, 0.1mL;

V 样总: 加入提取液体积, 1mL;

T: 反应时间, 5min;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$;

W: 样本质量, g;

五、 注意事项:

- 1、样本测试前请选取 2 个预期差异最大的样本, 稀释成不同浓度进行预试, 以选取最佳取样浓度;
- 2、 ΔA 如果小于 0.005, 可将反应时间延长, 计算时除以相应的反应时间即可; 如果高于 0.5 可将样本用提取液进行稀释, 计算时乘以相应的稀释倍数即可。