天净沙系列

CAT#:EC2.3.1.35

低温运输和保存

谷氨酸 N-乙酰转移酶活性测定试剂盒（比色法）

Glutamate N-Acetyltransferase Assay Kit

使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本产品用于测定谷氨酸 N-乙酰转移酶 (Glutamate N-Acetyltransferase，GLGAT，EC2.3.1.35）活性。其原理是 GLGAT 催化底物 N-乙酰鸟氨酸和谷氨酸反应生成 L-鸟氨酸，之后 L-鸟氨酸与改良型茚三酮反应生成了有色化合物，该有色化合物又在氢氧化钠作用下在 470 nm 处有特征光吸收，故通过监测吸光度随时间的增加，即可间接计算酶活性。本产品具有如下特点：

1. 即开即用，使用便捷，用户不需要优化条件，只需准备待测样本。
2. 最低检测限为 0.18 U，线性范围在 0.25 U-0.71 U 之间。
3. 本试剂盒 1 个酶活性单位的定义是在 37℃ pH 7.0 的条件下，每分钟能催化 1 μmol 底物转化所需的酶量。由于 1 个 N-乙酰鸟氨酸的转化将产生 1 个 L-鸟氨酸分子，故 1 个酶活性单位相当于在 37℃ pH 7.0 的条件下每分钟催化产生 1 μmol L-鸟氨酸产生所需的酶量。
4. 本产品足够 100 次 1 mL 体系的比色皿检测或 400 次 250 μL 体系的 96 孔板检测。
5. 本产品只可用于科研。

规格及成分

本产品使用塑料袋包装

成份	编号	规格	包装
GLGAT 活性测定底物干粉	EC2.3.1.35s	100 T	60 mL 本色瓶
GLGAT 活性测定显色液	EC2.3.1.35c	50 mL	50 mL 棕色瓶
GLGAT 活性测定反应液	EC2.3.1.35r	50 mL	60 mL 本色瓶
L-鸟氨酸干粉	CAS:70-26-8	100 T	1.5 mL 本色管
使用手册	EC2.3.1.35sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，2-8℃保存，有效期一年。

自备物品

待测样本、4 M 氢氧化钠溶液、样本缓冲液、分光光度计、1 mL 比色皿

使用方法

一、首次使用本试剂盒时配制下列溶液

1. 配制 GLGAT 活性测定底物液：将 40 mL GLGAT 活性测定反应液加入到装有 GLGAT 活性测定底物干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次溶解，得 GLGAT 活性测定底物液。
2. 配制 1 mM L-鸟氨酸溶液：将 1 mL GLGAT 活性测定反应液加入到装有 L-鸟氨酸干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次溶解，得 1 mM L-鸟氨酸溶液。

二、待测样本的制备

3. 用自选方式制备待测样本，样本溶于缓冲液中，缓冲液 pH 值控制为 7.0。

注意：由于 Mg^{2+}、Mn^{2+}和吡哆醛-5'-磷酸会严重影响谷氨酸 N-乙酰转移酶活性，故样本中不得含有这些物质。同时，由于本试剂盒测定的是 L-鸟氨酸，故样本中也不得有 L-鸟氨酸的成分。

4. 预留 10 mL 最后溶解样本的样本溶解液，作为后续测光吸收时的阴性对照。

5. 用自备试剂测定待测样本的蛋白浓度，以备后续计算比活时使用。

三、标准曲线梯度稀释液的制备

6. 每次测量都应制作标准曲线，下面以 6 个稀释度的标准曲线为例。

7. 标记 1-6 个 1.5 mL 离心管，每个管中加入 0.7 mL 超纯水。

8. 将第 2 步制备的 1 mM L-鸟氨酸溶液为 1 号管样品。

9. 2 号管中加入 0.7 mL 在第 2 步制备的 1 mM L-鸟氨酸溶液，充分震荡 1 分钟，得 0.5 mM L-鸟氨酸溶液。放冰上待用。

10. 换枪头，在 3 号管中加入 0.7 mL 0.5 mM L-鸟氨酸溶液（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 250 μM L-鸟氨酸溶液。放冰上待用。

11. 重复上面的操作直到得到 1 mM、0.5 mM、250 μM、125 μM、62.5 μM、31.25 μM 共 6 个稀释度的样品。放冰上待用。

四、用光径 1 cm 的比色皿测定光吸收

12. 标记 N+7 个 1.5 mL 的塑料离心管，其中 N 个用于待测样品，1 个用于阴性对照，6 个用于标曲。

13. 按下表加入各成分：

成分	阴性对照	N 个样本管	6 个标曲管
各梯度的 L-鸟氨酸溶液	不加	不加	各 100 μL
GLGAT 活性测定底物液	400 μL	各 400 μL	各 400 μL
GLGAT 活性测定显色液	400 μL	各 400 μL	各 400 μL
涡旋振荡 30 秒混匀，迅速加入下列成份后开始计时			
自备样本溶解液	100 μL	各 80 μL	不加
N 个自备待测样本	不加	各 20 μL	不加
混合均匀 37℃保温 30 min，沸水浴灭活 10 min			
自备 4 M 氢氧化钠溶液	100 μL	各 100 μL	100 μL
总体积	1 mL	1 mL	1 mL

14. 冷却到室温后迅速用分光光度计在 470 nm 测定 OD，测前用蒸馏水调零。

五、数据分析

15. 计算真实 OD470 光吸收：每个样本测得的光吸收减去阴性对照的光吸收即

	为每个样本的光吸收。共 N+6 个读数 16. 制备标准曲线：以 L-鸟氨酸溶液的浓度为横轴，以其真实 OD470 光吸收为纵轴，绘制标准曲线。 17. 根据计算公式，用 N 个样本的 OD470 数据计算出其所对应的 L-鸟氨酸浓度。根据谷氨酸 N-乙酰转移酶活性的定义（每分钟产生 1 μmol L-鸟氨酸所需要的酶量为 1 个单位）计算出酶的活性。 18. 计算样本的酶比活性：样本总体积乘以酶浓度 U/mL 即得样本总酶单位数 U，样本总体积乘以其蛋白浓度即得样本总蛋白量（以 mg 为单位），样本酶比活（U/mg）=总酶单位数/总蛋白量。 **六、96 孔板检测** 19. 操作同上，只是在设置反应时，各成份的用量降低 75%，只用 25%。同时光径不是 1 cm，要根据所用 96 孔板修改（需要咨询厂家）。
关联产品	D-氨基酸 N-乙酰转移酶活性测定试剂盒