

谷氨酸合成酶(GOGAT)活性检测试剂盒

中文名称：谷氨酸合成酶(GOGAT)活性检测试剂盒

英文名称：Glutamate Synthase(GOGAT) Activity Assay Kit

别名：谷氨酸合成酶试剂盒 GOGATKit 谷氨酸合成酶(GOGAT)试剂盒谷氨酸合成酶(GOGAT)测试盒

产品包装：盒装

产品规格：100T/96S

储存条件：-20°C

检测方法：微量法

推荐：若使用96孔板测定，需使用96孔UV板

有效期：6个月

产品简介：GOGAT 主要存在于原核生物、酵母菌及高等植物非绿色组织的前质体中，和谷氨酰胺合成酶(GS)共同构成 GS/GOGAT 循环，参与氨同化的调控。GOGAT 以 NADH 为电子供体，催化谷氨酰胺的氨基转移到 α -酮戊二酸形成两分子的谷氨酸，NADH 在 340nm 吸光度的下降速率可以反映 GOGAT 活性大小。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×2 支	4°C保存
试剂三	粉剂×2 支	4°C保存
试剂四	粉剂×2 支	-20°C保存

溶液的配制：

工作液的配制：取试剂二、试剂三、试剂四各一支加入 10mL 试剂一中溶解，现用现配，可分装后-20℃保存，避免反复冻融。

产品说明：

GOGAT 主要存在于原核生物、酵母菌及高等植物非绿色组织的前质体中，和谷氨酰胺合成酶(GS)共同构成 GS/GOGAT 循环，参与氨同化的调控。GOGAT 以 NADH 为电子供体，催化谷氨酰胺的氨基转移到 α -酮戊二酸形成两分子的谷氨酸，NADH 在 340nm 吸光度的下降速率可以反映 GOGAT 活性大小。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理(可适当调整待测样本量)

- 1、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量(10^4 个)：提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例(建议 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 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)；10000g4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 2、组织：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)，进行冰浴匀浆。10000g4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤：

- 1、紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，分光光度计蒸馏水调

零。

2、工作液提前配置，平衡至室温。

3、样本测定

试剂名称(μL)	测定管
工作液	180
样本	20

在微量石英比色皿或者 96 孔 UV 板中混匀，加样本的同时开始计时，在 340nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1，比色后迅速将比色皿连同反应液一起放入 25°C 水浴或培养箱中准确反应 5 分钟(若酶标仪带有控温功能，将温度调至 25°C);迅速取出比色皿并擦干，340nm 下比色，记录 5 分 20 秒时的吸光度 A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

1、按微量石英比色皿计算

(1)按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GOGAT(U/mgprot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 321.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2)按样本质量计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟消耗 1nmolNADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GOGAT(U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321.5 \times \Delta A \div W$$

(3)按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1nmolNADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GOGAT(U/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：

比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.02mL；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；W：样本质量，g；500：细菌或细胞

总数，500 万； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

2、按 96 孔 UV 板计算：

将上述公式中的 d-1cm 改为 d-0.6cm(96 孔 UV 板光径)进行计算即可。

注意事项:

- 1、测定期间样本在冰上放置, 以免变性和失活。
- 2、两个人同时做此实验, 一个人比色, 一个人计时, 以保证实验结果的准确性。
- 3、当 A1 大于 1.5 或者 ΔA 大于 0.6(酶标仪 ΔA 大于 0.4)时, 建议将样本用蒸馏水稀释后测定, 当 ΔA 过小时, 可以延长酶促反应时间(10min 或 15min)或者加大加入的样本体积进行测量。
- 4、由于提取液中含有一定浓度的蛋白(约 1mg/mL), 所以在测定样品蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量。

实验实例:

- 1、取 0.1g 红豆芽加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清后按照测定步骤操作, 用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A = A_1 - A_2 = 1.3015 - 1.0895 = 0.212$, 按样本质量计算酶活得:
$$\text{GOGAT(U/g 质量)} = 321.5 \times \Delta A \div W = 321.5 \times 0.212 \div 0.1 = 681.58 \text{U/g 质量}.$$
- 2、取 0.1g 吊兰加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清后按照测定步骤操作, 用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A = A_1 - A_2 = 0.9753 - 0.966 = 0.0093$, 按样本质量计算酶活得:
$$\text{GOGAT(U/g 质量)} = 321.5 \times \Delta A \div W = 321.5 \times 0.0093 \div 0.1 = 29.9 \text{U/g 质量}.$$