

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0371

Size: 100T/96S

谷氨酸合成酶 (GOGAT) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

GOGAT广泛分布于植物中,和谷氨酰胺合成酶共同构成GS/GOGAT 循环,参与氨同化的调控。

二、测定原理:

GOGAT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;同时NADH氧化生成NAD⁺,340nm吸光度的下降速率可以反映GOGAT活性大小。

三、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 孔板(ZC-1036:UV板)、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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×1 瓶	4°C保存	

五、粗酶液提取:

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(10⁴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);8000g 4°C离心10min,取上清,置冰上待测。

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。8000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

六、测定步骤:

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

2、样本测定

(1) 在试剂二中加入 18mL 试剂一充分溶解混匀, 置于 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 5min; 现配现用;

(2) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 20 μ L 样本和 180 μ L 试剂二, 混匀, 立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 5min 20s 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

七、GOGAT 活性计算:

● 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(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。

$$\text{GOGAT (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T$$
$$= 321 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算:

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

$$\text{GOGAT (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 321 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

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

$$\text{GOGAT (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 0.642 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$: 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; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 5 min; 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。

● 用96孔板 (UV板) 测定的计算公式如下

(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。

$$\text{GOGAT (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$
$$= 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每g组织每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{GOGAT (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 643 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

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

$$\text{GOGAT (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 1.286 \times \Delta A$$

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: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.02 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL;
T: 反应时间, 5 min; 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。