

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-S0644

Size: 50T/48S

谷氨酸合成酶（GOGAT）检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*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分布于植物中，和谷氨酰胺合成酶共同构成GS/GOGAT循环，参与氮同化的调控。

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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 石英比色皿、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 60mL × 1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 60mL × 1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 × 1 支	4℃保存	
试剂三	粉剂 × 1 支	4℃保存	
试剂四	粉剂 × 1 支	-20℃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（ 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）；8000g 4℃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℃离心10min，取上清，置冰上待测。

六、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. 样本测定

（1）工作液的配制：临用前将试剂二、三、四转移到试剂一中混合溶解，置于 37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴5min；现配现用；

（2）取0.1mL样本和1mL工作液于1mL比色皿中，混匀，加工作液的同时开始计时，在340nm波长下记录20秒时的初始吸光度A1和5分20秒时的吸光度A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

七、GOGAT 活性计算：

（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。

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

$$T = 354 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

（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。

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

$$= 354 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{GOGAT (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 0.708 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， 1.1×10^{-3} 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，0.1 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； T ：
反应时间，5 min； C_{pr} ：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。