

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

货号：ZC-S0644

规格：50管/48样

谷氨酸合成酶 (Glutamate synthase, GOGAT) 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

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。

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。

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。

试剂组成和配制：

| 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 | - |

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。

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 $\Delta A=A1-A2$ 。

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 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 样: 加入样本体积, 0.1 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。