



## 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 $\alpha$ -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。

**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( $\mu$ L)	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 分钟 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,  $2 \times 10^{-4}\text{L}$ ;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3\text{L/mol/cm}$ ; 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  $\Delta A$  大于 0.6(酶标仪  $\Delta A$  大于 0.4)时, 建议将样本用蒸馏水稀释后测定, 当  $\Delta A$  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  $\Delta A = A1 - A2 = 1.3015 - 1.0895 = 0.212$ , 按样本质量计算酶活得:

$GOGAT(U/g \text{ 质量}) = 321.5 \times \Delta A \div W = 321.5 \times 0.212 \div 0.1 = 681.58 U/g \text{ 质量}$ 。

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  $\Delta A = A1 - A2 = 0.9753 - 0.966 = 0.0093$ , 按样本质量计算酶活得:

$GOGAT(U/g \text{ 质量}) = 321.5 \times \Delta A \div W = 321.5 \times 0.0093 \div 0.1 = 29.9 U/g \text{ 质量}$ 。