

谷氨酸合成酶（GOGAT）含量检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PMHC6-M96	谷氨酸合成酶（GOGAT）试剂盒	96T	微量法

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。

试剂组成：

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

溶液的配制：

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

操作步骤：

一、样本处理

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）；10000g 4℃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。10000g 4℃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℃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℃);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 $\Delta A=A1-A2$ 。

三、GOGAT 活性计算

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。

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

(2)按样本质量计算:

单位的定义:每g组织每分钟消耗1nmol NADH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1nmol NADH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、最好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 A_{11} 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。