

谷氨酸合成酶（GOGAT）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1122

产品规格：100管/96样

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 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。

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。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体100mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×2支	2-8℃
试剂三	粉剂×2支	2-8℃
试剂四	粉剂×2支	-20℃

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。

试验中所需的仪器和试剂：

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（仅供参考）：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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：



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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°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 20 秒时的吸光度 A2, 计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

三、GOGAT 活性计算

a. 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, $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ 。

b. 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 A1 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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com