

谷氨酸合成酶(GOGAT)活性检测试剂盒说明书

Glutamate Synthase Assay Kit

紫外分光光度法

货号: AK076

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES11	60mL × 1 瓶	4℃保存;
AK076-A	60mL × 1 瓶	4℃保存;
AK076-B	粉剂 × 1 支	4℃保存;
AK076-C	粉剂 × 1 支	4℃保存;
AK076-D	粉剂 × 1 支	4℃保存;
工作液的配制: 临用前将 AK076-B, C, D 转移到 AK076-A 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; 可分装后-20℃保存 1 周, 避免反复冻融。		

简介:

意义: 谷氨酸合成酶 (Glutamate Synthase, 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, 参与氮同化的调控。

原理: 谷氨酸合成酶 (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⁺, 在 340nm 吸光度的下降速率可以反映 GOGAT 活性大小。

自备用品:

紫外分光光度计、台式离心机、1ml 石英比色皿、水浴锅、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和双蒸水

粗酶液提取:

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 (10⁴ 个): 提取液 ES11 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 ES11), 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 ES11 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 ES11), 进行冰浴匀浆; 10000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

1. 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 样本测定:
取 0.1mL 样本和 0.9mL 工作液于 1mL 比色皿中, 混匀, 加工作液的同时开始计时, 在 340 nm 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; 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 $\Delta A = A1 - A2$ 。

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1 nmol 的NADH 定义为一个酶活力单位。
$$\text{GOGAT (U/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) \div T = 321.5 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$
2. 按样本鲜重计算:

单位的定义：每g 组织每分钟消耗1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GOGAT (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d \times 10^9)] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321.5 \times \Delta A \div W$$

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1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GOGAT (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.643 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积， 1×10^{-3} L； ϵ ：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，0.1 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； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

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 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。