400-901-9800
sales@bioss.com.cn
support@bioss.com.cn
www.bioss.com.cn

谷氨酸合成酶(GOGAT)活性检测试剂盒说明书

Glutamate Synthase Assay Kit

微量法

货号：AK077

规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
提取液 ES11	120mL×1 瓶	4℃保存；
AK077-A	20mL×1 瓶	4℃保存；
AK077-B	粉剂×1 支	4℃保存；
AK077-C	粉剂×1 支	4℃保存；
AK077-D	粉剂×1 支	4℃保存；
工作液的配制：临用前将 AK077-B, C, D 转移到 AK077-A 中混合溶解现配现用；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，参与氨同化的调控。

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/酶标仪、台式离心机、微量石英比色皿/96 孔板、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（10^4 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/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
2. 样本测定：

   取 20ul 样本和 180uL 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 ΔA=A1-A2。

GOGAT 活性计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

GOGAT (U/mg prot) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T = 321.5×ΔA÷Cpr

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。

   GOGAT (U/g 鲜重) = [ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(W ×V 样÷V 样总)÷T = 321.5×ΔA÷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。

   GOGAT (U/10^4 cell) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(500×V 样÷V 样总)÷T = 0.643×ΔA

   注：V 反总：反应体系总体积，2×10^{-4} L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.02 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，1mol =10^9nmol。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

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。

   GOGAT (U/mg prot) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T = 643×ΔA÷Cpr

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。

   GOGAT (U/g 鲜重) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(W×V 样÷V 样总)÷T = 643×ΔA÷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。

   GOGAT (U/10^4 cell) = [ΔA×V 反总÷(ε×d)×10^9]÷(500×V 样÷V 样总)÷T = 1.286×ΔA

   注： 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：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.02 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，1mol =10^9nmol。。

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。