

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;
工作液配制: AK077-B 加入 18mL AK077-A 充分溶解混匀, 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 5min; 现配现用;		

简介:

意义: 谷氨酸合成酶 (Glutamate Synthase, GOGAT) 广泛分布于植物中, 和谷氨酰胺合成酶共同构成 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⁺, 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、微量石英比色皿/96 孔板、水浴锅、可调式移液枪、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); 8000g 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。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 样本测定,
在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 20 μ L 样本和 180 μ L 工作液(需要现配), 混匀, 立即记录 340nm 处 20 秒时的吸光值 A1 和 5 分 20 秒后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

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。

$$\text{GOGAT (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 321 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{GOGAT (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{GOGAT (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.642 \times \Delta A$$

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：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。

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。

$$\text{GOGAT (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 643 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{GOGAT (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{GOGAT (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.286 \times \Delta A$$

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。