

谷氨酸合成酶(GOGAT)检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-N029 微板法 96 样)

有效期: 3 个月

测定意义:

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, 参与氨同化的调控。

测定原理:

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。

需自备的仪器和用品:

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 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制:

提取液: 液体 100mL×1 瓶, -20℃ 保存;

试剂一: 液体 20mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 粉剂×1 瓶, -20℃ 保存;

粗酶液提取:

1、收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (功率 20%, 超声 3 秒, 间隔 10 秒, 重复 30 次); 8000g 4℃ 离心 10 分钟, 取上清, 置冰上待测。

2、称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10 分钟, 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

(1) 在试剂二中加入 18mL 试剂一充分溶解混匀, 25℃ 水浴 5min;

(2) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 20 μ L 样本和 180 μ L 试剂二, 混匀, 立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A_1 和 5min20s 后的吸光值 A_2 , 计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

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。

$$\text{GOGAT (U/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 322 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{GOGAT (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 322 \times \Delta A \div W$$

(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。

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

$V \text{ 反总}$: 反应体系总体积, $2. \times 10^{-4}$ L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ mol/L/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm; $V \text{ 样}$: 加入样本体积, 0.02 mL; $V \text{ 样总}$: 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 : 样品质量, 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。

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

(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。

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

(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。

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

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 mol/L/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: 样品质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。