

## 谷氨酸合成酶 (GOGAT) 检测试剂盒说明书

(货号: ADS-F-N029 分光法 48 样)

有效期: 3 个月

### 测定意义:

GOGAT 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  $\alpha$ -酮戊二酸, 形成两分子的谷氨酸; 同时 NADH 氧化生成  $\text{NAD}^+$ , 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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

### 试剂组成和配制:

提取液: 液体 60mL×1 瓶,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存;

试剂一: 液体 60mL×1 瓶,  $4^{\circ}\text{C}$  保存;

试剂二: 粉剂×1 支,  $4^{\circ}\text{C}$  保存;

试剂三: 粉剂×1 支,  $4^{\circ}\text{C}$  保存;

试剂四: 粉剂×1 支,  $-20^{\circ}\text{C}$  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);  $8000g$   $4^{\circ}\text{C}$  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。 $8000g$   $4^{\circ}\text{C}$  离心 10 分钟, 取上清, 置冰上待测。

### 测定步骤:

1、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

(1) 工作液的配制: 临用前将试剂二、三、四转移到试剂一中混合溶解, 置于  $25^{\circ}\text{C}$  水浴 5min;

(2) 取 1mL 工作液和 0.1mL 样本于 1mL 比色皿中, 混匀, 加样本的同时开始计时, 在 340 nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度  $A_1$  和 5 分 20 秒时的吸光度  $A_2$ , 计算  $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

### 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。

$$\text{GOGAT (U/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 354 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{GOGAT (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 354 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{GOGAT (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times 500) \div T = 0.707 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积,  $1.1 \times 10^{-3}$  L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  mol/L/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: 样品质量, g; 500: 细菌或细胞总数,

500 万。

