

谷氨酸合成酶（Glutamate synthase, GOGAT）试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

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，参与氮同化的调控。

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NAD<sup>+</sup>，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，4℃保存；

试剂一：液体20mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×2瓶，4℃保存；

粗酶液提取：

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<sup>4</sup>个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL提取液），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。

组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液），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

（1）在试剂二中加入9mL试剂一充分溶解混匀，置于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴5min；**现配现用（配好后3h内用完）**；

（2）在微量石英比色皿或96孔板中加入20 $\mu$ L样本和180 $\mu$ L试剂二，混匀，立即记录340nm处20s时的吸光值A<sub>1</sub>和 5min20s后的吸光值A<sub>2</sub>，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。

$$\text{GOGAT (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 321 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{GOGAT (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{GOGAT (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.642 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  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。

$$\text{GOGAT (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 643 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{GOGAT (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{GOGAT (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.286 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  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。