

谷氨酸合成酶（GOGAT）活性检测试剂盒（紫外分光光度法）

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

产品货号：BA1121

产品规格：50管/48样

产品简介：

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。

GOGAT以NADH为电子供体，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，NADH在340nm吸光度的下降速率可以反映GOGAT活性大小。

产品内容：

提取液：液体60mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体60mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×2支，4℃保存；

试剂三：粉剂×2支，4℃保存；

试剂四：粉剂×2支，-20℃保存。

工作液的配制：取试剂二、试剂三、试剂四各一支加入30mL试剂一中溶解。现用现配。可分装后-20℃保存，避免反复冻融。

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/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、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（ 10^4 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）；10000g 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。10000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤：

- 1、紫外分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，光度计蒸馏水调零。
- 2、工作液提前配置，平衡至室温。
- 3、样本测定：

试剂名称（ μ L）	测定管
工作液	900
样品	100

混匀，加样品的同时开始计时，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 $\Delta A=A1-A2$ 。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

三、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1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{GOGAT (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 321.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每g组织每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{GOGAT (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321.5 \times \Delta A \div W$$

(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1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

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

V反总：反应体系总体积， 10^{-3} L； ϵ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.1mL；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。

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，建议将样品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）或者加大加入的样品体积进行测量。
- 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com