

谷氨酸合成酶（GOGAT）活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号：BC0070

规格：50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	液体 60 mL×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

溶液的配制：

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

产品说明：

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，参与氮同化的调控。

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。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

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、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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。

2、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，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 (μL)	测定管
工作液	900
样本	100
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 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 $\Delta A = A1 - A2$ 。	

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。

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

(2) 按样本质量计算：

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。

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

(3) 按细菌或细胞数量计算：

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，10⁻³L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³L/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，1mL；T：反应时间，5min；C_{pr}：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；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

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，建议将样本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）或者加大加入的样本体积进行测量。
- 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。

实验实例：

- 1、取 0.1g 红豆芽加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = A1 - A2 = 1.23 - 1.067 = 0.163$ ，按样本质量计算酶活得：
 $\text{GOGAT (U/g 质量)} = 321.5 \times \Delta A \div W = 321.5 \times 0.163 \div 0.1 = 524 \text{ U/g 质量}。$
- 2、取 0.1g 稗草加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = A1 - A2 = 1.416 - 1.404 = 0.012$ ，按样本质量计算酶活得：
 $\text{GOGAT (U/g 质量)} = 321.5 \times \Delta A \div W = 321.5 \times 0.012 \div 0.1 = 38.58 \text{ U/g 质量}。$

相关发表文献：

[1] Fei Ding, Qiannan Hu, Meiling Wang, et al. Knockout of SLSBPASE Suppresses Carbon Assimilation and Alters Nitrogen Metabolism in Tomato Plants. International Journal of Molecular Sciences. December 2018; (IF4.183)

[2] Jie Wang,Wei Zhou,Hui Chen,et al. Ammonium Nitrogen Tolerant Chlorella Strain Screening and Its Damaging Effects on Photosynthesis. Frontier in Immunology. January 2019;(IF4.259)

[3] Meng L, Li W, Zhang S, et al. Effects of sucrose amendment on ammonia assimilation during sewage sludge composting[J]. Bioresource technology, 2016, 210: 160-166.

参考文献：

[1] del Pilar Cordovilla M, Pérez J, Ligeró F, et al. Partial purification and characterization of NADH-glutamate synthase from faba bean (*Vicia faba*) root nodules[J]. Plant science, 2000, 150(2): 121-128.

相关系列产品：

BC0080/BC0085 硝酸还原酶（NR）活性检测试剂盒

BC1500/BC1505 植物硝态氮含量检测试剂盒

BC1520/BC1525 植物氨态氮含量检测试剂盒

BC1480/BC1485 水土中亚硝酸盐含量测定试剂盒

BC1490/BC1495 食品中亚硝酸盐含量检测试剂盒

