

谷氨酸合成酶（GOGAT）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC0075

规格：100T/96S

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 100 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 支	2-8℃保存
试剂三	粉剂×2 支	2-8℃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 10 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。

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。

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 UV 板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、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 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/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、工作液提前配制，平衡至室温。





3、样本测定：

试剂名称 (μL)	测定管
工作液	180
样本	20

在微量石英比色皿或者 96 孔 UV 板中混匀，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 A1，比色后迅速将微量石英连同反应液一起放入 25°C 水浴或培养箱中准确反应 5 分钟（若酶标仪带有控温功能，将温度调至 25°C）；迅速取出微量石英比色皿并擦干，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、按微量石英比色皿计算：

(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。

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

(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。

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

(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。

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

V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：微量石英比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.02mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，5min；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； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

2、按 96 孔 UV 板计算：

将上述公式中的 d-1cm 改为 d-0.6cm（96 孔 UV 板光径）进行计算即可。

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（酶标仪 ΔA 大于 0.4）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，用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A = A1 - A2 = 1.3015 - 1.0895 = 0.212$ ，按样本质量计算酶活得：
GOGAT 活性 (U/g 质量) = $321.5 \times \Delta A \div W = 321.5 \times 0.212 \div 0.1 = 681.58$ U/g 质量。
- 2、取 0.1g 吊兰加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A = A1 - A2 = 0.9753 - 0.966 = 0.0093$ ，按样本质量计算酶活得：



GOGAT 活性 (U/g 质量) = $321.5 \times \Delta A \div W = 321.5 \times 0.0093 \div 0.1 = 29.9$ U/g 质量。

相关发表文献:

- [1] Huang Y, Qin M, Lai J, Liang J, Luo X, Li C. Assessing OBT formation and enrichment: ROS signaling is involved in the radiation hormesis induced by tritium exposure in algae. *J Hazard Mater.* 2023 Feb 5;443(Pt A):130159. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.130159. Epub 2022 Oct 12. PMID: 36283218.
- [2] Chen T, Zhao MX, Tang XY, Wei WX, Wen X, Zhou SZ, Ma BH, Zou YD, Zhang N, Mi JD, Wang Y, Liao XD, Wu YB. The tigeccycline resistance gene tetX has an expensive fitness cost based on increased outer membrane permeability and metabolic burden in *Escherichia coli*. *J Hazard Mater.* 2023 Sep 15; 458:131889. doi: 10.1016/j.jhazmat.2023.131889. Epub 2023 Jun 19. PMID: 37348375.
- [3] Chu G, Wang Q, Song C, Liu J, Zhao Y, Lu S, Zhang Z, Jin C, Gao M. *Platymonas helgolandica*-driven nitrogen removal from mariculture wastewater under different photoperiods: Performance evaluation, enzyme activity and transcriptional response. *Bioresour Technol.* 2023 Mar; 372:128700. doi: 10.1016/j.biortech.2023.128700. Epub 2023 Feb 2. PMID: 36738978.
- [4] Chen Z, Qiu S, Li M, Zhou D, Ge S. Instant Inhibition and Subsequent Self-Adaptation of *Chlorella* sp. Toward Free Ammonia Shock in Wastewater: Physiological and Genetic Responses. *Environ Sci Technol.* 2022 Jul 5;56(13):9641-9650. doi: 10.1021/acs.est.1c08001. Epub 2022 Jun 23. PMID: 35737736.
- [5] Chen C, Chu Y, Huang Q, Zhang W, Ding C, Zhang J, Li B, Zhang T, Li Z, Su X. Morphological, physiological, and transcriptional responses to low nitrogen stress in *Populus deltoides* Marsh. clones with contrasting nitrogen use efficiency. *BMC Genomics.* 2021 Sep 27;22(1):697. doi: 10.1186/s12864-021-07991-7. PMID: 34579659; PMCID: PMC8474845.

参考文献:

- [1] del Pilar Cordovilla M, Pérez J, Ligerio 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.
- [2] Singh R P, Srivastava H S. Increase in glutamate synthase (NADH) activity in maize seedlings in response to nitrate and ammonium nitrogen [J]. *Physiologia Plantarum*, 1986, 66: 413-416.
- [3] Meng S, Zhang CX, Su L. et al. Nitrogen uptake and metabolism of *Populus simonii* in response to PEG-induced drought stress [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2016, 123: 78-87.

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

