

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：E-BC-K659-M

产品规格：48T(48 samples)/96T(96 samples)

检测仪器：酶标仪(330-350 nm)

Elabscience®谷氨酸合成酶（GOGAT）比色法测试盒

Glutamate Synthase (GOGAT) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织、植物组织、血清样本中的谷氨酸合成酶 (GOGAT)的酶活测定。

检测原理

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 340 nm 吸光度的下降速率可以反映 GOGAT 活性高低。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extraction Solution)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	16 mL×1 瓶	26 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 A (Substrate A)	粉剂×2 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 B (Substrate B)	粉剂×2 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 (Chromogenic Agent)	粉剂×2 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔紫外酶标板	96 孔×1 块		无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪 (330-350 nm, 最佳检测波长 340 nm)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 反应工作液的配制：

48T：取试剂三、试剂四、试剂五各一支加入到7.5 mL试剂二中溶解，现用现配，2-8℃避光可保存12 h。

96T：取试剂三、试剂四、试剂五各一支加入12.5 mL试剂二中溶解，现用现配，2-8℃避光可保存12 h。

样本准备

① 样本处理

组织样本：取新鲜动物或植物组织0.1 g, 加入0.9 mL的试剂一匀浆, 10000 × g, 4℃ 离心10 min, 弃沉淀取上清待测。留取部分上清进行蛋白浓度测定。

血清样本：直接测定

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：8.84-321.05 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%姬菇	不稀释	10%大鼠心组织	2-4
10%白玉菇	不稀释	10%小鼠肝组织	2-4
10%大鼠肾组织	2-4	牛血清	不稀释
10%大鼠肝组织	2-4		

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

- ① 应确保配制好的反应工作液中粉末完全溶解。
- ② 若实验中测定的样本过多，建议以 4 个为一组进行测定。

操作步骤

- ① 测定孔：取 20 μ L 待测样本，分别加入相应的酶标孔中。
- ② 向①中加入 200 μ L 反应工作液。
- ③ 震板 5 s，酶标仪波长 340 nm 下测定样本第 0 min 的 OD 值 A_1 ，25℃ 孵育 4 min，4 min 后测定样本的 OD 值 A_2 。

操作表

	测定孔
待测样本(μ L)	20
反应工作液(μ L)	200
震板 5 s，酶标仪波长 340 nm 下测定样本第 0 min 的 OD 值 A_1 ，25℃ 孵育 4 min，4 min 后测定样本的 OD 值 A_2 。	

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

组织样本中谷氨酸合成酶(GOGAT)活力计算公式:

定义: 25°C 条件下, 每克组织蛋白每分钟催化分解 1 μmol NADH 所需的酶量为一个酶活单位。

$$\text{谷氨酸合成酶活力 (U/gprot)} = \frac{\Delta A_{340}}{\varepsilon \times d} \times \frac{V_{\text{总}}}{V_{\text{样}}} \div C_{\text{pr}} \div T \times f \times 10^6$$

血清血浆样本中谷氨酸合成酶(GOGAT)活力计算公式:

定义: 25°C 条件下, 每升血清血浆每分钟催化分解生成 1 μmol 的 NADH 所需要的酶量为一个酶活单位。

$$\text{谷氨酸合成酶活力 (U/L)} = \frac{\Delta A_{340}}{\varepsilon \times d} \times \frac{V_{\text{总}}}{V_{\text{样}}} \div T \times f \times 10^6$$

注解:

ΔA_{340} : 第 0 min 的 OD 值 - 第 4 min 的 OD 值 ($A_1 - A_2$)

$V_{\text{总}}$: 反应体系总体积, 0.22 mL

ε : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$

d : 比色皿光径, 0.65 cm

10^6 : 单位换算系数, $1 \text{ mol} = 1 \times 10^6 \mu\text{mol}$

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02 mL

C_{pr} : 样本蛋白质浓度, gprot/L

T : 反应时间, 4 min

f : 样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	8.84–321.05 U/L	平均批间差	5.8 %
灵敏度	8.84 U/L	平均批内差	2.5 %
平均回收率	104 %		

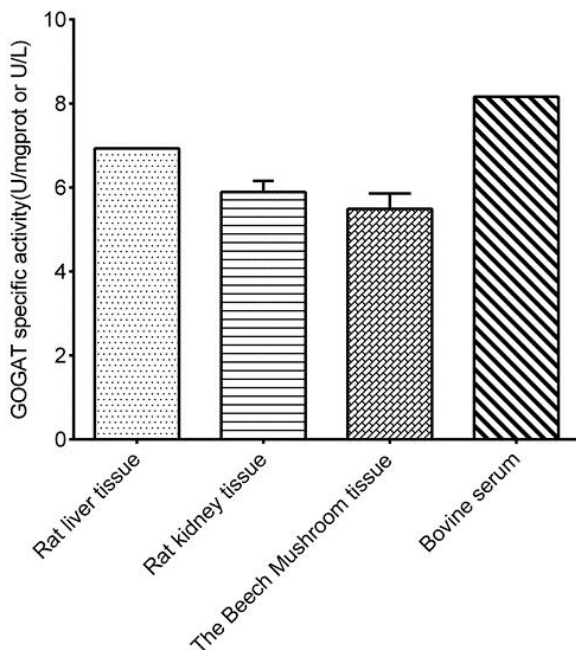
附录2 实例分析

例如检测10%大鼠肝组织(数据仅供参考):

制备的10%大鼠肝组织上清液用试剂一稀释4倍,取稀释后的样本20 μL ,按操作表操作,结果如下:25 $^{\circ}\text{C}$ 下,测定样本第0 min的OD值 A_1 为0.875,25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 min后测定OD值 A_2 为0.842, $\Delta A_{340} = A_1 - A_2 = 0.875 - 0.842 = 0.033$,10%大鼠肝组织匀浆蛋白浓度为12.96 gprot/L,计算结果为:

$$\frac{\text{谷氨酸合成酶活力 (U/gprot)}}{\text{(U/gprot)}} = \frac{0.033}{6220 \times 0.65} \times \frac{0.22}{0.02} \div 12.96 \div 4 \times 4 \times 10^6 = 6.93 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作,测定大鼠肝组织(10%匀浆蛋白浓度为12.96 gprot/L,稀释4倍,加样量20 μL)、大鼠肾组织(10%匀浆蛋白浓度为7.16 gprot/L,稀释4倍,加样量20 μL)、白玉菇组织(10%白玉菇组织匀浆蛋白浓度为1.30 gprot/L,不稀释,加样量20 μL)、牛血清(不稀释,加样量为20 μL)中的谷氨酸合成酶活力(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	未严格按照说明书操作	严格按照说明书操作
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适稀释倍数,重新检测
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本,重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用,如将其用于临床诊断或任何其他用途,我公司将不对因此产生的问题负责,亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器,严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低,请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中,建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责,不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责,使用前请充分考虑样本可能的使用量,预留充足的样本。