

NADH-谷氨酸合成酶(NADH-GOGAT)试剂盒

- 【产品简介】 ◆谷氨酸合成酶(GOGAT)广泛分布于植物中,植物吸收的无机氮经硝酸还原糖(NR)和亚硝酸还原酶(NIR)还原成 NH_4 后,通过谷氨酰胺合成酶(GOGAT)参与的GS/GOGAT途径才能进行氮素的同化和利用。GOGAT一般包含两类:一类是多存在于叶绿体(叶片)中的Fd-GOGAT,另一类是多存在于非绿色组织(根)前质体中的NADH-GOGAT。
- ◆NADH-谷氨酸合成酶(NADH-GOGAT, EC 1.4.1.14)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;同时NADH氧化生成 NAD^+ ,可以通过检测340nm吸光度的下降速率得出NADH-GOGAT的酶活性大小。
- ◆该酶催化的反应: $\text{L-glutamine} + 2\text{-oxoglutarate} + \text{NADH} + \text{H}^+ = 2\text{L-glutamate} + \text{NAD}^+$

【货号】 TPL002

【规格】 96T

【包装清单】

试剂名称	规格	保存条件	
提取液	液体120mL×1瓶	4℃	
试剂一	粉剂mg×3支	4℃	用前甩几下或4℃离心使试剂落入试管底部,每支再用1.5mL的提取液充分溶解,用不完的试剂分装后-20℃保存,禁止反复冻融,三天内用完。
试剂二	粉剂mg×2瓶	4℃	用前甩几下或4℃离心使试剂落入试管底部,每个试剂瓶再用7mL的提取液充分溶解,仍4℃保存。

【保存条件】 4℃保存,有效期一年。

【操作步骤】 1、样本制备：

①组织样本：称取约0.1g 组织(水分多的样本取0.5g)，加入1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

注：若增加样本量，可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为1:5~10 的比例进行提取，若样本颜色较深(如植物叶片)，可引起起始值A1值较大如超过1.5，可在样本制备过程中增加除色素步骤：取约0.2g组织(水分充足的样本可取1g)，加入80%乙醇冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心10min，弃掉色素较深的上清液；以上除色素步骤重复2次。最后向离心得到的沉淀中加入1mL提取液，混匀或再次冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心10min，取上清置冰上待测。

②细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取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，300W，超声3s，间隔 7s，总时间3min)；12000rpm，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

注：若增加样本量，按照细菌/细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为500~1000:1的比例进行提取。

2、上机测定：

①酶标仪预热30min 以上，调节波长至340nm。

②在 96孔板中依次加入：

试剂名称(uL)	测定管
样本	20
试剂一	40
试剂二	140
混匀，340nm下进行时长扫描，1min时读取A1，10min后读取A2值， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

3、结果计算

①按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADH-GOGAT (nmol Glu/min/mg prot)} = 2 \times [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 6430.9 \times \Delta A \div \text{Cpr} \div T$$

②按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADH-GOGAT (nmol Glu/min/g鲜重)} = 2 \times [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 6430.9 \times \Delta A \div W \div T$$

③按细胞数量计算：

单位定义：每万细胞每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADH-GOGAT (nmol Glu/min/10}^4\text{cell)} = 2 \times [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 6430.9 \times \Delta A \div 500 \div T$$

V--提取液体积，1mL；

V1--加入样本体积，0.02 mL；

V2--反应总体积, 2×10^{-4} L; d--96 孔板光径, 0.5 cm;
 ϵ -NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; 500--细胞数量, 万;
T--反应时间, 本实验中是10min, 若线性区间的时间改变则以实际检测时间代入公式计算;
Cpr--样本蛋白质浓度, mg/mL;
2----每合成 2nmol的 Glu 有1nmol的NADH被氧化;
W--样本质量, g;

- 【注意事项】**
- 1、测定过程中样本应在冰上放置, 以免变性和失活。
 - 2、样本多时, 应分批进行检测, 以确保组间反应时间一致。
 - 3、本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
 - 4、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。