

Glutamate Synthase(NADH-GOGAT) Activity Assay Kit

NADH-谷氨酸合成酶（NADH-GOGAT）活性检测试剂盒 微板法

产品编号	产品名称	规格
BL1069B	NADH-谷氨酸合成酶（NADH-GOGAT）活性检测试剂盒 非绿色组织 微板法	96T

产品简介:

谷氨酸合成酶（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。GOGAT 广泛分布于植物中，植物吸收的无机氮经硝酸还原酶（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。

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： $\text{L-glutamine} + 2\text{-oxoglutarate} + \text{NADH} + \text{H}^+ = 2 \text{L-glutamate} + \text{NAD}^+$

产品组成:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉末×3 支	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，每瓶加入 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	粉末×2 瓶	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，每瓶加入 14mL 的提取液充分溶解，仍 4℃保存。

使用方法:

建议正式实验前，选取 2 个样本做预测定，了解实验样品情况，熟悉流程，避免样本和试剂浪费！

一、样本准备:

1. 组织样本:

- 称取约 0.1g 组织（水分充足的样本可以取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆；
- 12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上测定。

【注】：1. 根据研究需求，可按组织质量（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 5×10^6 个细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 300w，超声 3 秒，

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。



间隔 7 秒，总时间 3min）；

(c) 12000rpm，室温离心 15min，取上清测定。

【注】：若增加样本量，可按每 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个细菌/细胞数量加入 1mL 提取液的比例进行提取。

二、样品测定：

1. 酶标仪预热 30min，设定波长到 340nm。

2. 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	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， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

【注】：1. 若 A1 太大如超过 2（如颜色较深的植物叶片，一般色素较高，则起始值相对会偏高），可以适当减少样本加样量 V1（如减至 10μL，另外 10μL 用提取液补齐），则改变后的 V1 需代入计算公式重新计算。或者减少试剂一的加样量（如减至 20μL，另外 20μL 用蒸馏水补齐）或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm，4℃离心 10min，上清液用于检测；

2. 若 ΔA 的值大于 0.4，则需减少反应时间（如减少至 5min），则改变后的反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

3. 若下降趋势不稳定，可以每隔 20S 读取一次吸光值，选取一段线性下降的时间段来参与计算，相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。

三、结果计算

1. 按蛋白浓度计算：

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

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

2. 按样本质量计算：

单位定义：每克组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

V--提取液体积，1 mL

V2--反应总体积， 2×10^{-4} L

d--96 孔板光径，0.5cm

T--反应时间，本实验中是 10min

2--每合成 2nmol 的 Glu 有 1nmol 的 NADH 被氧化

V1--加入样本体积，0.02mL

ϵ --NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm

W--样本质量，g

Cpr---上清液蛋白质浓度（mg/mL）

注意事项：

1. 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。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：

4℃保存三个月。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。

