

NADH-谷氨酸合成酶 (Glutamate synthase, NADH-GOGAT) 试剂盒说明书

(货号: G0403W 微板法 96 样)

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

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×3 支	4℃保存	使用前甩几下或 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℃保存	使用前甩几下或 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。

【注】: 粉剂量在 mg 级别, 使用前用手甩几次或者进行离心, 打开直接加入要求的试剂即可。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、NADH-GOGAT 酶活性检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、粗酶液提取:

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、测定步骤:

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 (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。

五、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 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、按样本鲜重计算:

单位的定义: 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;

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, 0.5cm;

ϵ --NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm;

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; 建议使用本公司 BCA 蛋白含量测定试剂盒;

2---每合成 2nmol 的 Glu 有 1nmol 的 NADH 被氧化; W--样本质量, g;