Glutamate synthase Activity Assay Kit

NADH-谷氨酸合成酶（NADH-GOGAT）试剂盒说明书

货号：G0403W48 | 方法：微板法 | 规格：48 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：L-glutamine + 2-oxoglutarate + NADH + H^+=2 L-glutamate + 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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	4℃保存	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×1 瓶	4℃保存	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 9mL 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，ΔA=A1-A2。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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。

NADH-GOGAT(nmol Glu/min/mg prot)=2×[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(V1×Cpr) ÷T

=6430.9×ΔA÷Cpr ÷T

2、按样本鲜重计算：

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。

NADH-GOGAT(nmol Glu/min/g 鲜重)=2×[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(W×V1÷V)÷T

=6430.9×ΔA÷W÷T

3、按细胞数量计算：

单位定义：每万细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

NADH-GOGAT(nmol Glu/min/10^4cell)=2×[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(500×V1÷V)÷T

=6430.9×ΔA÷500÷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；　　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；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；

For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.
本产品仅供科研使用，不得用于临床诊断或治疗。