

NADH-谷氨酸合成酶（Glutamate synthase, NADH-GOGAT）试剂盒说明书 （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°C保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部，每支再用 2.2mL 的提取液充分溶解，用不完的试剂分装后-20°C保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂二	粉剂 mg×2 瓶	4°C保存	用前甩几下或 4°C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°C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：

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°C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°C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°C离心 10min，取上清置冰上待测。

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，	

$$\Delta A = A_1 - A_2。$$

- 【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 10 μ L，另外 10 μ L 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 20 μ L，另外 20 μ L 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 $^{\circ}$ C 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。

$$\begin{aligned} \text{NADH-GOGAT (nmol Glu/min/mg prot)} &= 2 \times [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 6430.9 \times \Delta A \div \text{Cpr} \div T \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{NADH-GOGAT (nmol Glu /min/g 鲜重)} &= 2 \times [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 6430.9 \times \Delta A \div W \div T \end{aligned}$$

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 $\times 10^{-4}$ L；

d--96 孔板光径，0.5cm；

ϵ --NADH 摩尔消光系数，6.22 $\times 10^3$ 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；