

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

(货号: ADS-F-N002 紫外分光法 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: $\text{L-glutamine} + 2\text{-oxoglutarate} + \text{NADH} + \text{H}^+ = 2 \text{L-glutamate} + \text{NAD}^+$

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 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 2 支	4°C保存	使用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 每瓶加入 4.2mL 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 2 瓶	4°C保存	使用前甩几下或 4°C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°C保存。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、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°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 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°C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 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- ② 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	80
试剂一	160
试剂二	560
混匀，于 340nm 下检测，1min 时读取 A1，10min 后读取 A2 值， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【注】1. 若 ΔA 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 40μL，另外 40μL 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 80μL，另外 80μL 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°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。

$$\begin{aligned} \text{NADH-GOGAT}(\text{nmol Glu}/\text{min}/\text{mg prot}) &= 2 \times [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 3215.4 \times \Delta A \div \text{Cpr} \div T \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{NADH-GOGAT}(\text{nmol Glu}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= 2 \times [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 3215.4 \times \Delta A \div W \div T \end{aligned}$$

V --提取液体积，1 mL；

$V1$ --加入样本体积，0.08mL；

$V2$ --反应总体积， 8×10^{-4} L；

ϵ --NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；

d --1mL 石英比色皿光径，1cm；

W --样本质量，g；

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；

2--每合成 2nmol 的 Glu 有 1nmol 的 NADH 被氧化；

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。