

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

（货号：BP10350F 紫外法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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。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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 2 瓶	4℃ 保存	每瓶： 1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 每瓶加入 4.2mL 的提取液充分溶解； 3. 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 2 瓶	4℃ 保存	每瓶： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 每瓶加入 15mL 的提取液充分溶解，仍 4℃ 保存。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

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，可在样本提取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 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：

试剂组分（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 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 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℃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。

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

$$= 3215.4 \times \Delta A \div \text{Cpr} \div T$$

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。

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

$$= 3215.4 \times \Delta A \div W \div T$$

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，6.22×10³ 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。