

NADH-谷氨酸合成酶(NADH-GOGAT)活性检测试剂盒 非绿色组织 微板法

产品编号	产品名称	包装规格
NBS8101-96T	NADH-谷氨酸合成酶(NADH-GOGAT)活性检测试剂盒 非绿色组织 微板法	96T

产品简介:

谷氨酸合成酶(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。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。

NADH-谷氨酸合成酶(NADH-GOGAT, EC1.4.1.14)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: $\text{L-glutamine} + 2\text{-oxoglutarate} + \text{NADH} + \text{H}^+ = 2\text{ L-glutamate} + \text{NAD}^+$ 。

保存条件:

2-8℃保存,三个月有效。

产品组成:

组分	规格	保存	备注
提取液	110mL×1瓶	2-8℃保存	
试剂一	粉末×3支	2-8℃保存	用前甩几下或4℃离心使试剂落入试管底部,每瓶加入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	粉末×2瓶	2-8℃保存	用前甩几下或4℃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℃保存。

产品使用：

建议正式实验前，选取 2 个样本做预测定，了解实验样品情况，熟悉流程，避免样本和试剂浪费！

一、样本准备：

1. 组织样本：

(a) 称取约 0.1g 组织（水分充足的样本可以取 0.5g），加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆；

(b) 12000rpm，4℃离心 10min，取上清，置冰上测定。

【注】：1. 根据研究需求，可按组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例进行提取。

2. 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：

(a) 先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；

(b) 取 5×10^6 个细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；

(c) 12000rpm，室温离心 15min，取上清测定。

【注】：若增加样本量，可按每 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个细菌/细胞数量加入 1mL 提取液的比例进行提取。

二、样品测定：

1. 酶标仪预热 30min，设定波长到 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 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。

三、结果计算

1. 按蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{NADH-GOGAT}(\text{nmol Glu/min/mg prot}) &= 2 \times [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 6430.9 \times \Delta A \div \text{Cpr} \div T\end{aligned}$$

2. 按样本质量计算:

单位定义: 每克组织每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{NADH-GOGAT}(\text{nmol Glu/min/g 鲜重}) &= 2 \times [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 6430.9 \times \Delta A \div W \div T\end{aligned}$$

V--提取液体积, 1mL

V1--加入样本体积, 0.02mL

V2--反应总体积, 2×10^{-4} L

ϵ --NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm

d--96 孔板光径, 0.5cm

W--样本质量, g

T--反应时间, 本实验中是 10min

Cpr---上清液蛋白质浓度 (mg/mL)

2--每合成 2nmol 的 Glu 有 1nmol 的 NADH 被氧化

注意事项:

1. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

本产品仅用于生命科学研究, 不得用于医学诊断及其他用途!

相关产品：

产品编号	产品名称	包装规格
<u>NBS8089-48T</u>	<u>辅酶 I NAD⁺/NADH 含量测定试剂盒 分光法</u>	48T
<u>NBS8091-96T</u>	<u>辅酶 I NAD⁺/NADH 含量测定试剂盒 微板法</u>	96T
<u>NBS8092-48T</u>	<u>辅酶 II NADP⁺/NADPH 含量测定试剂盒 分光法</u>	48T
<u>NBS8093-96T</u>	<u>辅酶 II NADP⁺/NADPH 含量测定试剂盒 微板法</u>	96T
<u>NBS8094-100T</u>	<u>NAD⁺/NADH 检测试剂盒 (WST-8 法)</u>	100T
<u>NBS8095-100T</u>	<u>NADP⁺/NADPH 检测试剂盒 (WST-8 法)</u>	100T
<u>NBS8096-48T</u>	<u>NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒 分光法</u>	48T
<u>NBS8097-96T</u>	<u>NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒 微板法</u>	96T
<u>NBS8098-48T</u>	<u>NADH-谷氨酸脱氢酶 (NADH-GDH) 活性检测试剂盒 分光法</u>	48T
<u>NBS8099-96T</u>	<u>NADH-谷氨酸脱氢酶 (NADH-GDH) 活性检测试剂盒 微板法</u>	96T
<u>NBS8100-48T</u>	<u>NADH-谷氨酸合成酶 (NADH-GOGAT) 活性检测试剂盒 非绿色组织 分光法</u>	48T
<u>NBS8101-96T</u>	<u>NADH-谷氨酸合成酶 (NADH-GOGAT) 活性检测试剂盒 非绿色组织 微板法</u>	96T
<u>NBS8102-24T</u>	<u>NADPH 氧化酶 (NAO) 活性检测试剂盒 分光法</u>	24T
<u>NBS8103-48T</u>	<u>NADPH 氧化酶 (NAO) 活性检测试剂盒 微板法</u>	48T
<u>NBS8104-48T</u>	<u>NAD-苹果酸脱氢酶 (NAD-MDH) 活性检测试剂盒 (线粒体和胞质) 分光法</u>	48T
<u>NBS8105-96T</u>	<u>NAD-苹果酸脱氢酶 (NAD-MDH) 活性检测试剂盒 (线粒体和胞质) 微板法</u>	96T
<u>NBS8106-96T</u>	<u>NADP 苹果酸酶 (NADP-ME) 活性检测试剂盒 微板法</u>	96T