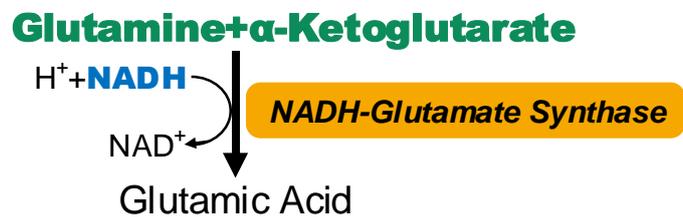




NADH-谷氨酸合成酶（NADH-GOGAT）活性检测试剂盒
NADH-Glutamate Synthase (NADH-GOGAT) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



NADH-谷氨酸合成酶 (NADH-GOGAT) 活性检测试剂盒

NADH-Glutamate Synthase (NADH-GOGAT) Activity Assay Kit

一、产品描述

谷氨酸合成酶 (GOGAT) 是植物体内氮素同化与循环的关键酶, 可催化谷氨酰胺和 α -酮戊二酸形成谷氨酸, 与谷氨酰胺合成酶 (GS) 共同构成 GS/GOGAT 循环, 参与氮的初级吸收与光呼吸释放氮的再吸收, 以及氮的同化和固氮作用。谷氨酸合成酶分为以 NADH 为还原剂的 NADH-GOGAT 和以铁氧还蛋白为还原剂的 Fd-GOGAT, NADH-GOGAT 主要存在于原核生物、酵母菌及高等植物非绿色组织的前质体中, Fd-GOGAT 主要存在于叶绿体基质中。

NADH-谷氨酸合成酶以 NADH 为电子供体, 催化谷氨酰胺的氨基转移到 α -酮戊二酸形成谷氨酸, NADH 在 340 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化即可表征 NADH-谷氨酸合成酶的活力。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 10 mL×2 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×2 瓶	-20°C避光保存

GOGAT 工作液的配制 (现用现配): 使用前每瓶试剂二中加入 10 mL 试剂一充分溶解; 可分装后-20°C保存, 避免反复冻融, 平衡至室温后使用。

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿 (光径 10 mm) /96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 粗酶液的制备 (可根据预实验结果适当调整样本量和比例)

①组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: (5-10) 的比例 (建议称取 0.1 g 组织, 加入 1 mL 提取液) 处理样品, 冰浴匀浆, 4°C 10000 g 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞: 离心收集细菌或细胞至离心管内, 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 (500-1000): 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液) 处理样品, 冰浴超声破碎 (功率 20%或 200 W, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 30 次), 4°C 10000 g 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。

2.测定步骤

- ①紫外分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。
- ②在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)
粗酶液	20
GOGAT 工作液	180

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 20 s（总时间）时 340 nm 处吸光值 A1；②25°C 准确反应 300 s，测定 320 s（总时间）时 340 nm 处吸光值 A2；③计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

3.NADH-谷氨酸合成酶（NADH-GOGAT）活力计算

3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

- ①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADH-GOGAT (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{643 \times \Delta A}{C_{\text{pr}}}$$

- ②按组织样本质量计算

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

$$\text{NADH-GOGAT (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{643 \times \Delta A}{W}$$

- ③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADH-GOGAT (U}/10^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{643 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.02 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：96 孔 UV 板光径，0.5 cm；T：反应时间，300 s=5 min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计； 10^9 ：单位换算系数，1 mol= 10^9 nmol。

3.1 使用微量石英比色皿测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADH-GOGAT (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{321.5 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

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

$$\text{NADH-GOGAT (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{321.5 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADH-GOGAT (U}/10^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{321.5 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.02 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：1 mL 石英比色皿光径，1 cm；T：反应时间，300 s=5 min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计； 10^9 ：单位换算系数，1 mol=10⁹ nmol。

四、注意事项

- ①测定过程中样本应保持冰上放置，以免变性和失活；
- ②准确在20 s和320 s处完成吸光值测定，以确保实验结果的准确性和重复性；若使用96孔UV板测定时，应使用多道移液器且分批进行检测，以确保组间反应时间一致；
- ③若A1大于1.5或 ΔA 大于0.6（酶标仪 ΔA 大于0.4），建议将粗酶液适当稀释后再进行测定；若 ΔA 小于0.02，建议适当延长酶促反应时间（10-15 min）或增加样本量后再进行测定，计算时相应修改；
- ④提取液中含有约1 mg/mL的蛋白，测定样本蛋白浓度时需要减去提取液的蛋白含量；
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取2-3个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

