NADH-谷氨酸合成酶（NADH-GOGAT）活性检测试剂盒说明书

规格：96 样　　方法：酶标仪法

一、注意事项

1. 使用前请通读一遍说明书再开始实验。
2. 正式检测前选取 2~3 个样本进行预检测。
3. 本试剂盒仅用于科研。

二、产品组分

试剂名称	试剂规格	保存条件	备注
提取液	105 mL×1	4℃	
试剂一	20 mL×1	4℃	
试剂二	粉剂×2	4℃	

三、仪器和用品

酶标仪、96 孔板、移液器、天平、可降温离心机、超纯水/蒸馏水、研磨仪/研钵、冰、水浴锅。

四、样品制备

1. 组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆，然后，8000 g，4℃，离心 10 min，置于冰上，上清为待测样本。

2. 细菌/细胞：按照细菌/细胞数量（10^4 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 200 W，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次）；然后 8000 g，4℃，离心 10 min，置于冰上，上清为待测样本。

五、测定步骤

1. 酶标仪预热 30 min 以上，波长调至 340 nm 处。
2. 在一瓶试剂二中加入 10 mL 试剂一充分溶解混匀，置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 5 min；现配现用（配好后 3 h 内用完）。
3. 在 96 孔板中依次加入：

	测定管
样本（μL）	20
试剂二（μL）	180
充分混匀后，准确测定 340 nm 处 20 s 时和 5 min 20 s 时的吸光度值，记 A1、A2，ΔA=A1-A2。	

六、计算

1. 按照样本质量计算：

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。

NADH-谷氨酸合成酶（NADH-GOGAT）活性（nmol/min/g 鲜重）

＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷（W×V 样÷V 样总）÷T=535.91×ΔA÷W

2. 按照蛋白质浓度计算（需另测蛋白浓度）：

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

NADH-谷氨酸合成酶（NADH-GOGAT）活性（nmol/min/mg prot）

＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷（V 样×Cpr）÷T=535.91×ΔA÷Cpr

3. 按细菌/细胞数量计算：

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

NADH-谷氨酸合成酶（NADH-GOGAT）活性（nmol/min/10^4 cell）

＝[ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷（N×V 样÷V 样总）÷T=535.91×ΔA÷N

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 孔板光径，0.6 cm；V 样：加入样本体积，0.02 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细菌或细胞数量，万个。

七、产品简介

NADH-谷氨酸合成酶（NADH-GOGAT）是植物体内依赖 NADH 作为电子供体的谷氨酸合成关键酶。主要功能是催化谷氨酰胺的酰胺基与α-酮戊二酸在还原条件下生成两分子谷氨酸，是植物 GS-GOGAT 循环中负责将谷氨酰胺转化为谷氨酸的核心酶之一，是评价植物非光合组织氮同化能力、氮素利用效率及生长发育调控的重要酶学指标。