

Fd-谷氨酸合成酶(Glutamate synthase, Fd-GOGAT)试剂盒

微量法 100 管/48 样

注意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

GOGAT 广泛分布于植物中，和谷氨酰胺合成酶共同构成 GS/GOGAT 循环，参与氨同化的调控。GOGAT 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。Fd-GOGAT 主要存在于叶绿体基质中，与光合作用和光呼吸有关，主要同化 NO₃-还原和光呼吸产生的 NH₄⁺。

测定原理：

Fd-GOGAT 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，谷氨酸脱氢酶催化谷氨酸的脱氢反应，同时产生 NADH，使 WST-8 显橙黄色，在 450 nm 下测定吸光值。

需自备的仪器和用品：

酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 100mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃保存；临用前加入 12mL 试剂六溶解待用，用不完的试剂 4℃保存；

试剂二：液体 6mL×1 瓶，4℃避光保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，4℃保存；临用前加入 5mL 蒸馏水溶解待用，用不完的试剂 4℃保存；

试剂四：粉剂×1 瓶，-20℃保存；临用前加入 20mL 试剂六溶解待用，用不完的试剂分装后-20℃保存；

试剂五：液体 3mL×1 瓶，4℃避光保存；

试剂六：液体 40mL×1 瓶，4℃保存；

粗酶液提取：

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 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。10000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

2、样本测定

在 EP 管中加入如下试剂

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	100	50
试剂二	100	50
充分混匀, 30℃保温 5min		
样本	50	50
试剂三	50	
水		50
充分混匀, 30℃准确反应 30min, 95℃水浴 5min 终止反应, 冷却后 10000g 4℃离心 5min, 取上清液待测		

3、工作液配制

临用前按试剂四：试剂五=180:20 (μL) 的比例配制工作液，用多少配多少。

4、谷氨酸含量测定

在 96 孔板中加入如下试剂

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
上清液	20	20

混匀, 25℃反应 30min, 450nm 下测定吸光值 A 测定与对照, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$, 每个测定管设一个对照管。

Fd-GOGAT 活性计算:

标准曲线为 $y = 2.2168x - 0.0005$, $R^2 = 0.9996$; 其中 x 为标准品浓度 $\mu\text{mol/mL}$, y 为吸光值 ΔA 。

1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol 的谷氨酸定义为一个酶活力单位。Fd-GOGAT

$$(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = (\Delta A + 0.0005) \div 2.2168 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times 1000$$

$$= 75.2 \times (\Delta A + 0.0005) \div \text{Cpr}$$

2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟产生 1 nmol 的谷氨酸定义为一个酶活力单位。Fd-GOGAT (nmol/min/g 鲜重) = $(\Delta A + 0.0005) \div 2.2168 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000$

$$= 75.2 \times (\Delta A + 0.0005) \div W$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.25mL; ε: V 样: 加入样本体积, 0.05 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 30 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 1000, μmol 到 nmol 的换算系数。

