

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

(货号: G0404F 分光法 24 样)

一、产品简介:

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(GS)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。

Fd-谷氨酸合成酶(Fd-GOGAT, EC 1.4.7.1)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;再用特异于谷氨酸的酶复合体分解谷氨酸,同时与显色剂反应生成黄色物质,该物质在 450nm 处有最大吸收峰,进而得到 Fd-谷氨酸合成酶的酶活性大小。

该酶催化反应: $\text{L-glutamine} + 2\text{-oxoglutarate} + 2\text{reduced ferredoxin} + 2\text{H}^+ = 2\text{L-glutamate} + 2\text{oxidized ferredoxin}$ 。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部,再加 6mL 的提取液充分溶解,仍 4℃保存。
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部,再加 3mL 的提取液充分溶解,仍 4℃保存。
试剂三	粉剂 mg×1 瓶	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部,再加 6mL 的提取液充分溶解,仍 4℃保存。
试剂四	试剂四 A mg×3 支 试剂四 B mg×3 支	4℃保存	临用前一支试剂 A 和 B 分别用 1mL 蒸馏水完全溶解,再把 1mL 试剂 B 倒入 1mL 试剂 A 中混成试剂四 mix(一周内用完)。
试剂五	液体 4.5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部,再加 1.8mL 蒸馏水溶解,仍-20℃保存。
试剂七	液体 1mL×1 支	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部,避免试剂浪费。
标准品	液体 mL×1 支	4℃保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、水浴锅、可调式移液器、研钵和蒸馏水。

四、Fd-GOGAT 酶活性检测:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

- 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 的比例提取。

- 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、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃），或可放在 25℃条件下水浴 5-15min。
- ③ 第③步的显色反应：试剂五和六和七可按照 70:30:20 比例配成混合液（一枪加 120μL 该混合液，最后加上清液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。
- ④ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	100	100
试剂二	100	
试剂三	100	100
混匀，30℃孵育 5 分钟		
样本	200	200
蒸馏水		100
试剂四	100	100
混匀，30℃反应 30min（准确时间）后，立即于 95℃沸水中水浴 5 分钟，室温放置 10min 后至室温（务必使温度降至室温或流水加速冷却至室温），至室温后务必于漩涡震荡仪上剧烈振荡 5min，再于 12000rpm 离心 5min，上清液待测。		

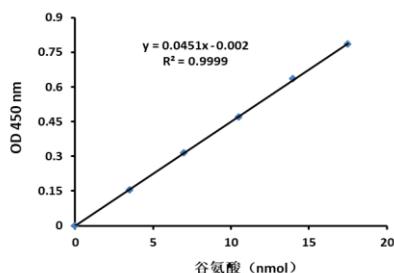
- ③ 显色反应：在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
提取液	230	230
试剂五	70	70
试剂六	30	30
上清液	350	350
试剂七	20	20
混匀，30℃反应 15min，液体全部转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，立即于 450nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本需设一个自身对照）。		

- 【注】1.若 ΔA 差值在零附近徘徊，可以在显色反应阶段增加上清液（V3）的量（如增加到 500μL，则提取液相应减少）；或延长第②步中 30℃反应时间 T（如由 30min 增加至 60min），或增加取样质量 W（如由 0.1g 增至 0.2g），则改变后的 V3 和 T 和 W 需代入计算公式重新计算。
- 2.若 A 测定的值大于 1.2，则可降低显色反应阶段增加上清液（V3）的量（如减至 150μL，则提取液相应增加或者用水补充）。则改变后的 V3 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

- 1、标准曲线方程为 $y = 0.0451x - 0.002$ ；x 为标准品谷氨酸的摩尔质量 (nmol)，y 为 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每小时生成 1 nmol 的谷氨酸定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.002) \div 0.0451] \times (V2 \div V3) \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 380.1 \times (\Delta A + 0.002) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每小时生成 1 nmol 的谷氨酸定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.002) \div 0.0451] \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 380.1 \times (\Delta A + 0.002) \div W\end{aligned}$$

4、按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每百万细菌或细胞每小时生成 1 nmol 的谷氨酸定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned}\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.002) \div 0.0451] \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.76 \times (\Delta A + 0.002)\end{aligned}$$

V--提取液体积，1 mL； V1--加入样本体积，0.2mL； V2--反应总体积，0.6mL；

V3--显色阶段上清液体积，0.35mL； T--反应时间，30min=1/2h； W--样本质量，g；

500---细胞数量，万；

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。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标准品母液（10nmol/μL）。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05. nmol/μL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据显色反应阶段，测定管的加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。

