

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

（微板法 48 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 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部,再加 6mL 的提取液充分溶解,仍 4°C保存。
试剂二	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部,再加 3mL 的提取液充分溶解,仍 4°C保存。
试剂三	粉剂 mg×1 瓶	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部,再加 6mL 的提取液充分溶解,仍 4°C保存。
试剂四	试剂四 A mg×3 支 试剂四 B mg×3 支	4°C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 2mL×1 瓶	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部,避免试剂浪费。
试剂六	粉剂 mg×1 支	-20°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解,仍-20°C保存。
试剂七	液体 1mL×1 支	4°C保存	用前甩几下或 4°C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°C保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

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°C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°C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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	50	50
试剂二	50	
试剂三	50	50
样本	100	100
蒸馏水		50
试剂四 mix	50	50

混匀，30°C反应 30min（准确时间）后，立即于 95°C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 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
提取液	60	60
试剂五	20	20
试剂六	10	10
上清液	100	100
试剂七	10	10

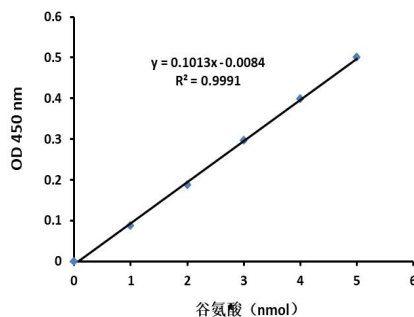
混匀，30°C反应 15min，**立即**于 450nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。（每个样本需设一个自身对照）

【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 150μL），则提取液相应减少；或延长第②步中 30°C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，则可降低显色反应阶段增加上清液（V3）的量（如减至 50μL，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 $y = 0.1013x - 0.0084$ ，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。

$$\begin{aligned} \text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0084) \div 0.1013] \times (V2 \div V3) \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 592.3 \times (\Delta A + 0.0084) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

$$\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/h/g 鲜重})=[(\Delta A+0.0084)\div 0.1013]\times(V2\div V3)\div(W\times V1\div V)\div T$$
$$=592.3\times(\Delta A+0.0084)\div W$$

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。

$$\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/h}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A+0.0084)\div 0.1013]\times(V2\div V3)\div(500\times V1\div V)\div T$$
$$=1.2\times(\Delta A+0.0084)$$

V---提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.1 mL； V2---反应总体积，0.3mL；

V3---显色阶段上清液体积，0.1mL； 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六个梯度：0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05. nmol/μL。也可根据实际样本来调整浓度。
- 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。