

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

(货号: G0404W96 微板法 96 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  $\text{NH}_4^+$ 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 $\alpha$ -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 120mL×1 瓶 液体 30mL×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 12mL 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 12mL 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 12mL 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 1.5mL 蒸馏水完全溶解,再把 1.5mL 试剂 B 倒入 1.5mL 试剂 A 中混成试剂四(一周内用完)。
试剂五	液体 4mL×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×2 支	-20°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部,每支再加 1.2mL 蒸馏水溶解,可分装后于 -20°C保存(尽量避免反复冻融)。
试剂七	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。
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,了解本批样品和实验流程,避免样本和试剂浪费!

#### 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℃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 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 20:10:10 比例配成混合液（一枪加 40μL 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	50	50
试剂二	50	50
试剂三	50	50
样本	100	100
蒸馏水		50
试剂四	50	

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。

- ⑤ 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

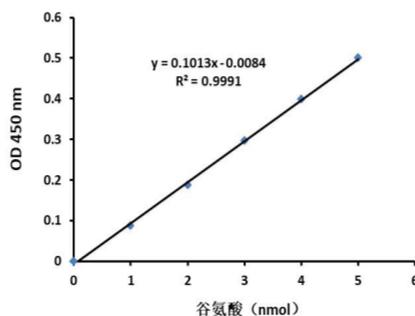
混匀，30℃反应 15min，立即于 450nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$  测定 - A 对照。（每个样本需设一个自身对照）

【注】1. 若  $\Delta A$  小于 0.01，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℃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 1.5，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  $\Delta A$ 。



## 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。

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

## 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。

