

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

微量法 100 管/48 样

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  $\text{NO}_3^-$  还原和光呼吸产生的  $\text{NH}_4^+$ 。

### 测定原理:

Fd-GOGAT 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, 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°C 保存;

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

试剂二: 液体 6mL×1 瓶, 4°C 避光保存;

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

试剂四: 粉剂×1 瓶, -20°C 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°C 保存;

试剂五: 液体 3mL×1 瓶, 4°C 避光保存;

试剂六: 液体 40mL×1 瓶, 4°C 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°C 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	100
试剂二	50	50
充分混匀, 30°C 保温 5min		
样本	50	50
试剂三	50	
水		50
充分混匀, 30°C 准确反应 30min, 95°C 水浴 5min 终止反应, 冷却后 10000g 4°C 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
工作液	180	180

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  $\Delta A$ 。

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。

$$\begin{aligned} \text{Fd-GOGAT (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0005) \div 2.2168 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 \\ &= 75.2 \times (\Delta A + 0.0005) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{Fd-GOGAT (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0005) \div 2.2168 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ &= 75.2 \times (\Delta A + 0.0005) \div W \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积，0.25mL； $\epsilon$ ：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， $\mu\text{mol}$  到 nmol 的换算系数。