

## 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 NO<sub>3</sub>-还原和光呼吸产生的 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>。

### 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℃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  $\Delta A$ 。

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

#### 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,  $\mu\text{mol}$  到 nmol 的换算系数。

