

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

分光光度法 50 管/24 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，参与氮同化的调控。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 NO₃-还原和光呼吸产生的 NH₄⁺。

测定原理：

Fd-GOGAT 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，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：

分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：粉剂×1 瓶，4℃保存；临用前加入 6mL 试剂六溶解待用，用不完的试剂 4℃保存；试剂二：液体 3mL×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 50mL 试剂六溶解待用，用不完的试剂分装后-20℃保存；

试剂五：液体 6mL×1 瓶，4℃避光保存；

试剂六：液体 60mL×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、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 蒸馏水调零。

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	50	
试剂一		50
充分混匀, 30℃保温 5min		
样本	50	50
试剂三	50	
水		50

3、工作液配制

临用前按试剂四: 试剂五= 900:100 (μL) 的比例配制工作液, 用多少配多少。

4、谷氨酸含量测定

在 1mL 玻璃比色皿中加入如下试剂

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
上清液	100	100
混匀, 25℃反应 30min, 450nm 下测定吸光值 A 测定与对照, $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$, 每个测定管设一个对照管。		

Fd-GOGAT 活性计算:

标准曲线为 $y = 4.4336x - 0.0005$, $R^2 = 0.9996$; 其中 x 为标准品浓度 $\mu\text{mol/mL}$, y 为吸光值 ΔA 。

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)= (ΔA+0.0005) ÷ 4.4336 × V 反总 ÷ (V 样 × Cpr) ÷ T × 1000 = 37.6 × (ΔA+0.0005) ÷ Cpr

(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) = (ΔA+0.0005) ÷ 4.4336 × V 反总 ÷ (W × V 样 ÷ V 样总) ÷ T × 1000

= 37.6 × (ΔA+0.0005) ÷ 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，μmol 到 nmol 的换算系数。