

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

(货号: ADS-W-N002-96 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 80mL×2 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	4℃ 保存	开盖前注意使粉剂落入底部 (可手动甩一甩); 再加 12mL 的提取液充分溶解, 仍 4℃ 保存。
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃ 保存	开盖前注意使粉剂落入底部 (可手动甩一甩); 再加 6mL 的提取液充分溶解, 仍 4℃ 保存。
试剂三	粉剂 1 瓶	4℃ 保存	开盖前注意使粉剂落入底部 (可手动甩一甩); 再加 12mL 的提取液充分溶解, 仍 4℃ 保存。
试剂四	试剂四 A 3 瓶 试剂四 B 3 支	4℃ 保存	每支: 1. 临用前一支试剂 A 和 B 分别用 2mL 蒸馏水完全溶解; 2. 再把 2mL 试剂 B 倒入 2mL 试剂 A 中混成试剂四 mix (一周内用完)。
试剂五	液体 4mL×1 瓶	4℃ 保存	1. 开盖前注意使液体落入底部 (可手动甩一甩), 避免试剂浪费; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂六	粉剂 2 支	-20℃ 保存	每支: 1. 临用前 8000g 4℃ 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩), 避免试剂浪费; 2. 每支再加 1.2mL 蒸馏水溶解, 仍 -20℃ 保存。
试剂七	液体 2mL×1 瓶	4℃ 避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩), 避免试剂浪费; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	液体 1 支	4℃ 保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

- 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℃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、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

- ② 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (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℃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。		

- ③ 显色反应：在 96 孔板中依次加入：

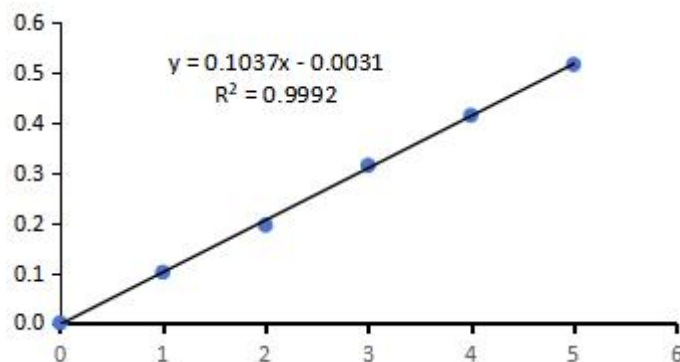
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
提取液	60	60
试剂五	20	20
试剂六	10	10
上清液	100	100
试剂七	10	10
混匀，30℃反应 15min，立即于 450nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。（每个样本需设一个自身对照）		

【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℃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 $y = 0.1037x - 0.0031$ ，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。

$$\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0031) \div 0.1037] \times (V2 \div V3) \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ = 578.6 \times (\Delta A + 0.0031) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0031) \div 0.1037] \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T \\ = 578.6 \times (\Delta A + 0.0031) \div W$$

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。

$$\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0031) \div 0.1037] \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ = 1.2 \times (\Delta A + 0.0031)$$

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 标准品母液浓度为 10nmol/μL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 nmol/μL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

1. 吸取标准品母液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 1nmol/μL 的标品稀释液；						
2. 吸取 1nmol/μL 的标品稀释液 50uL，加入 950uL 蒸馏水，混匀得到 0.05nmol/μL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 nmol/μL	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
-----------	-----	--------------

提取液	60	60
试剂五	20	20
试剂六	10	10
标品	100	
蒸馏水		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-0 浓度管。		