

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

(货号：BP10350F-48 分光法 48 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 110mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 1 瓶	4℃ 保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 12mL 的提取液充分溶解，仍 4℃ 保存。
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃ 保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 6mL 的提取液充分溶解，仍 4℃ 保存。
试剂三	粉剂 1 瓶	4℃ 保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 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	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 9mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂六	粉剂 1 瓶	-20℃ 保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部（可手动甩一甩）； 2. 再加 3.5mL 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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。

- ② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
试剂一	100	100
试剂二	100	
试剂三	100	100
混匀，30℃孵育 5 分钟		
样本	200	200
蒸馏水		100
试剂四	100	100
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 EP 管中依次加入：

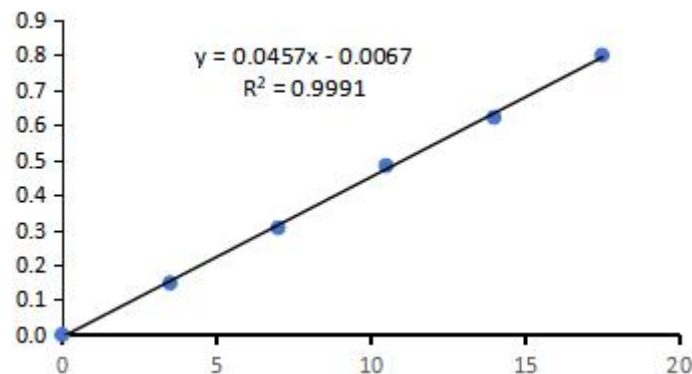
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
提取液	230	230
试剂五	70	70
试剂六	30	30
上清液	350	350
试剂七	20	20
混匀，30℃反应 15min，液体全部转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，立即于 450nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本需设一个自身对照）。		

【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 500μL，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 1.2，则可降低显色反应阶段增加上清液（V3）的量（如减至 150μL，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 $y = 0.0457x - 0.0067$; 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。

$$\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0067) \div 0.0457] \times (V2 \div V3) \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 375.1 \times (\Delta A + 0.0067) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0067) \div 0.0457] \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 375.1 \times (\Delta A + 0.0067) \div W$$

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。

$$\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0067) \div 0.0457] \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T$$

$$= 0.75 \times (\Delta A + 0.0067)$$

V--提取液体积, 1 mL; V1--加入样本体积, 0.2mL; V2--反应总体积, 0.6mL;

V3--显色阶段上清液体积, 0.35mL; 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 100uL, 加入 1900uL 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	80	160	240	320	400
水 uL	400	320	240	160	80	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	230	230
试剂五	70	70
试剂六	30	30
标品	350	
蒸馏水		350
试剂七	20	20
混匀，30℃反应 15min，液体全部转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，立即于 450nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		