

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

分光光度法 50 管/24 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 NO_3^- 还原和光呼吸产生的 NH_4^+ 。

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°C 保存;

试剂一: 粉剂×1 瓶, 4°C 保存; 临用前加入 6mL 试剂六溶解待用, 用不完的试剂 4°C 保存;

试剂二: 液体 3mL×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 50mL 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 6mL×1 瓶, 4°C 避光保存;

试剂六: 液体 60mL×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、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	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= 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
工作液	900	900

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 $y = 4.4336x - 0.0005$, $R^2 = 0.9996$; 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。

$$\begin{aligned} \text{Fd-GOGAT (nmol/min/mg prot)} &= (\Delta A + 0.0005) \div 4.4336 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 \\ &= 37.6 \times (\Delta A + 0.0005) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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。

$$\begin{aligned} \text{Fd-GOGAT (nmol/min/g 鲜重)} &= (\Delta A + 0.0005) \div 4.4336 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 \\ &= 37.6 \times (\Delta A + 0.0005) \div W \end{aligned}$$

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。