

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0995

Size: 100T/48S

Fd-谷氨酸合成酶 (Fd-GOGAT) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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 NO_3^- -还原和光呼吸产生的 NH_4^+ 。

二、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 450nm 下测定吸光值。

三、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。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100 mL×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	

五、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。

六、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	100
试剂二	50	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
工作液	180	180

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。

七、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 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 1nmol 的谷氨酸定义为一个酶活力单位。

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

2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每g 组织每分钟产生 1nmol 的谷氨酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{Fd-GOGAT (nmol/min/g 鲜重)} = (\Delta A + 0.0005) \div 2.2168 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ \times 1000 = 75.2 \times (\Delta A + 0.0005) \div W$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.25mL; ϵ : $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; T : 反应时间, 30 min; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; 1000, μmol 到 nmol 的换算系数。