

Fd-Glutamate Synthase (GOGAT) Activity Assay Kit

Fd-谷氨酸合成酶(Fd-GOGAT)活性检测试剂盒

产品编号	产品名称	规格
BL895B	Fd-谷氨酸合成酶(Fd-GOGAT)活性检测试剂盒	48T

产品简介:

谷氨酸合成酶 (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。植物吸收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, 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^+ ; 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) 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: $\text{L-glutamine} + 2\text{-oxoglutarate} + 2\text{reduced ferredoxin} + 2\text{H}^+ = 2\text{L-glutamate} + 2\text{oxidized ferredoxin}$ 。

产品组成:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉末×1 支	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 再加 6mL 的提取液充分溶解, 仍 4°C保存。
试剂二	粉末×1 支	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 再加 3mL 的提取液充分溶解, 仍 4°C保存。
试剂三	粉末×1 支	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 再加 6mL 的提取液充分溶解, 仍 4°C保存。
试剂四	A 粉末×3 支 B 粉末×3 支	4°C保存	临用前取一支试剂 A 和 B 分别用 1mL 蒸馏水完全溶解, 然后将 A、B 溶液混合成 MIX。
试剂五	液体 2mL×1 瓶	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 避免试剂浪费。
试剂六	粉末×1 支	-20°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解, 仍-20°C保存。
试剂七	液体 1mL×1	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部, 避免试剂浪费。
标准品	液体×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

使用方法:

建议正式实验前, 选取 2 个样本做预测定, 了解实验样品情况, 熟悉流程, 避免样本和试剂浪费!

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。



一、样本准备:

1. 组织样本:

- (a) 称取约 0.1g 样本 (水分多的样本取 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆;
- (b) 10000-12000g, 4°C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:

- (a) 收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清;
- (b) 取 5×10^6 个细菌或细胞加入 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);
- (c) 10000-12000g, 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照每 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ 个细菌/细胞加入 1mL 提取液进行提取。

二、样品测定:

1. 酶标仪预热 30min, 设定波长到 450nm, 蒸馏水调零。
2. 所有试剂解冻至室温 (25°C), 在离心管中依次加入:

试剂名称 (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 (此时溶液应为蓝色), 30°C反应 30min (准确时间), 立即于 95°C沸水中水浴 5 分钟后, 室温放置 10min 后至室温, 恢复室温后 (务必降至室温), 震荡混匀至颜色完全消失, 10000-12000g 离心 10 分钟, 上清液待测。		

3. 显色反应: 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (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°C反应 15min, 立即于 450nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$ (每个样本需设一个自身对照)。		

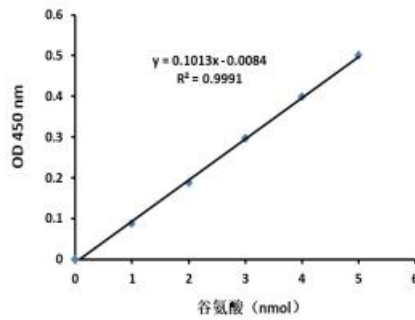
【注】: 1. 若 ΔA 差值在零附近徘徊, 可以在显色反应阶段增加上清液 (V3) 的量 (如增加到 150μL, 则提取液相应减少); 或延长第 2 步中 30°C反应时间 T (如由 30min 增加至 60min), 或增加取样质量 W (如由 0.1g 增至 0.2g), 改变后的 V3、T 和 W 需代入计算公式重新计算。

2. 若测 ΔA 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 50ul, 则提取液相应增加或者用水补充)。改变后的 V3 需代入计算公式重新计算。

三、含量计算

1. 标准曲线方程: $y = 0.1013x - 0.0084$; x 为谷氨酸摩尔质量 (nmol), y 为 ΔA 。





2. 按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白每分钟生成 1 nmol 的谷氨酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0084) \div 0.1013] \times (V2 \div V3) \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 592.3 \times (\Delta A + 0.0084) \div \text{Cpr}$$

3. 按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织每分钟生成 1 nmol 的谷氨酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0084) \div 0.1013] \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 592.3 \times (\Delta A + 0.0084) \div W$$

4. 按细菌或细胞密度计算:

单位定义: 每百万细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 的谷氨酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0084) \div 0.1013] \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T$$

$$= 1.2 \times (\Delta A + 0.0084)$$

V--提取液体积, 1 mL

V1--加入样本体积, 0.1mL

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, 本实验中是 30min

W--样本质量, g

500---细胞数量, 百万

Cpr--样本蛋白质浓度, mg/mL

附: 标准曲线制作过程:

- 1 标准品母液 (10nmol/μL)。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1. nmol/μL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据显色反应阶段, 测定管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。

注意事项:

- 1、因提取液中含有蛋白质沉淀剂, 因此上清液不能用于蛋白质浓度测定。如需测定蛋白质浓度, 需另取组织测定
- 2、本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品。
- 3、为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期:

-20°C保存三个月。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.

注意: 在体外研究使用, 不用于诊断或治疗用途, 本产品不是医疗装置。

