

Fd-Glutamate Synthase(GOGAT) Activity Assay Kit

Fd-谷氨酸合成酶(Fd-GOGAT)活性检测试剂盒 分光法

产品编号	产品名称	规格
BL895A	Fd-谷氨酸合成酶(Fd-GOGAT)活性检测试剂盒 分光法	24T

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	60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉末×1 支	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部, 再加 6mL 的提取液充分溶解, 仍 4℃保存。
试剂二	粉末×1 支	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部, 再加 3mL 的提取液充分溶解, 仍 4℃保存。
试剂三	粉末×1 支	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部, 再加 6mL 的提取液充分溶解, 仍 4℃保存。
试剂四 A	粉末×3 瓶	4℃保存	临用前一支试剂 A 和 B 分别用 1ml 蒸馏水完全溶解, 再把 1mL 试剂 B 倒入 1mL 试剂 A 中混成试剂四 mix(一周内用完)。
试剂四 B	粉末×3 瓶	4℃保存	
试剂五	4.5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	粉末×1 支	-20℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解, 仍-20℃保存。
试剂七	1mL×1 支	4℃保存	用前甩几下或 4℃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℃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:

- 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；
- 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:

- 收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；
- 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）；
- 12000rpm，4℃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

- 可见分光光度计预热 30min，设定波长到 450nm，蒸馏水调零。
- 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- 第 3 步的显色反应，试剂五和试剂六、七可按照 70:30:20 比例配成混合溶液（一枪加 120μL 该混合溶液，最后加上清液）（用多少赔多少，现配现用）。
- 在离心管中依次加入：

试剂名称（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），立即于 95℃沸水中水浴 5min 后，室温放置 10min 后（务必降至室温），务必涡旋剧烈振荡 5min，再 12000rpm 离心 10 分钟，上清液待测。		

5. 显色反应：在离心管中依次加入

试剂名称（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），则改变后的 V3 重新代入公式计算；或延长第 2 步中 30℃反应时间 T（如由 30min 增加至 60min），则改变后的反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

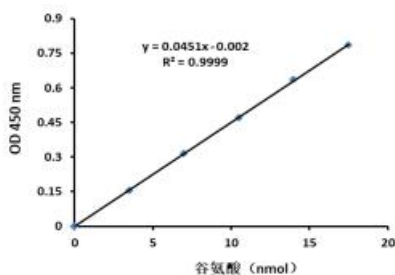
2.若 A 测定的值大于 1.2，则可降低显色反应阶段增加上清液(V3)的量(如减至 150μL，则提取液相应增加或者用水补充)。则改变后的 V3 需代入计算公式重新计算。

三、含量计算

- 标准曲线方程： $y = 0.0451x - 0.002$ ；x 为谷氨酸摩尔质量（nmol），y 为 ΔA 。

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。





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。

$$\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.002) \div 0.0451] \times (V2 \div V3) \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 380.1 \times (\Delta A + 0.002) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.002) \div 0.0451] \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 380.1 \times (\Delta A + 0.002) \div W$$

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。

$$\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.002) \div 0.0451] \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T$$

$$= 0.76 \times (\Delta A + 0.002)$$

V--提取液体积, 1 mL

V2--反应总体积, 0.6mL

T--反应时间, 30min=1/2h

500---细胞数量, 万

V1--加入样本体积, 0.2mL

V3--显色阶段上清液体积, 0.35mL

W--样本质量, g

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. 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。
2. 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℃保存三个月。

