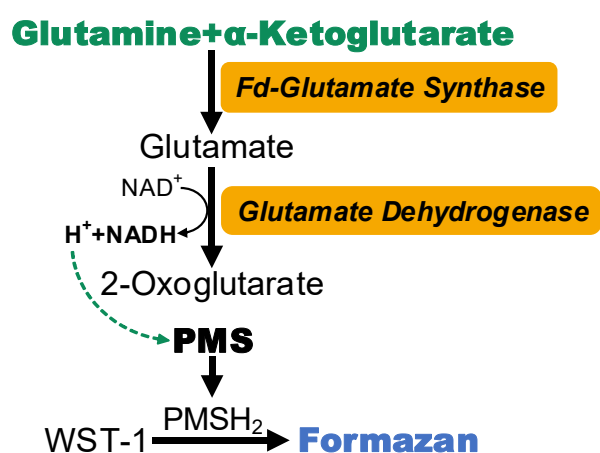




Fd-谷氨酸合成酶 (Fd-GOGAT) 活性检测试剂盒
Ferredoxin-Glutamate Synthase (Fd-GOGAT) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



Fd-谷氨酸合成酶 (Fd-GOGAT) 活性检测试剂盒

Ferredoxin-Glutamate Synthase (Fd-GOGAT) Activity Assay Kit

一、产品描述

谷氨酸合成酶 (GOGAT) 是植物体内氮素同化与循环的关键酶, 可催化谷氨酰胺和 α -酮戊二酸形成谷氨酸, 与谷氨酰胺合成酶 (GS) 共同构成 GS/GOGAT 循环, 参与氮的初级吸收与光呼吸释放氮的再吸收, 以及氮的同化和固氮作用。谷氨酸合成酶分为以 NADH 为还原剂的 NADH-GOGAT 和以铁氧还蛋白为还原剂的 Fd-GOGAT, NADH-GOGAT 主要存在于原核生物、酵母菌及高等植物非绿色组织的前质体中, Fd-GOGAT 主要存在于叶绿体基质中。

Fd-谷氨酸合成酶可催化谷氨酰胺生成谷氨酸, 谷氨酸脱氢酶进一步催化谷氨酸的脱氢反应, 同时还原 NAD 生成 NADH, NADH 在 1-mPMS 的作用下使 WST-1 显橙黄色, 产物在 450 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化即可表征 Fd-谷氨酸合成酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液	液体 120 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	粉剂×2 瓶	4°C 保存	使用前每瓶加入 12 mL 试剂六充分溶解 (配制后 4°C 可保存 1 个月)
试剂二	液体 12 mL×1 瓶	4°C 避光保存	-
试剂三	粉剂×3 瓶	4°C 保存	使用前每瓶加入 5 mL 蒸馏水充分溶解 (配制后 4°C 可保存 1 个月)
试剂四	粉剂×2 瓶	-20°C 避光保存	使用前每瓶加入 20 mL 试剂六充分溶解 (分装后 -20°C 可保存 1 个月, 避免反复冻融)
试剂五	液体 5 mL×1 瓶	4°C 避光保存	-
试剂六	液体 70 mL×1 瓶	4°C 保存	-
标准液	液体 1 mL×1 支	4°C 避光保存	10 μ mol/mL 谷氨酸标准液
标准稀释液的制备 (现用现配): 使用前将 10 μ mol/mL 谷氨酸标准液使用蒸馏水稀释至 0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05 μ mol/mL 即为标准稀释液。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 酶标仪、96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量和比例）

按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 10000 g 离心 10 min，取上清液即为粗酶液，置于冰上待测。

2.测定步骤

①酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 450 nm。

②灭活粗酶液的制备：吸取 200-300 μL 粗酶液至另一离心管中，95℃处理 10 min（密封以防止水分散失），冷却至室温后即为灭活粗酶液。

③检测工作液的制备（现用现配）：根据使用量按照试剂四：试剂五=9:1 的体积比配制。

④在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)	标准管 (μL)	空白管 (μL)
试剂一	100	100	-	-
试剂二	50	50	-	-
充分混匀，30℃孵育 5 min				
粗酶液	50	-	-	-
灭活粗酶液	-	50	-	-
试剂三	50	50	-	-
①充分混匀，30℃准确反应 30 min				
②立即 95℃处理 5 min，冷却至室温				
③4℃ 10000 g 离心 5 min，取上清液				
在 96 孔板中依次加入下列试剂：				
上清液	20	20	-	-
标准稀释液	-	-	20	-
蒸馏水	-	-	-	20
检测工作液	180	180	180	180
充分混匀，25℃反应 30 min				

注：95℃处理过程中注意密封以防止水分散失。

吸光值测定：测定 450 nm 处吸光值，记为 A 测定和 A 对照；计算 ΔA 测定=A 测定-A 对照， ΔA 标准=A 标准-A 空白。注：每个样品均需设一个对照管，各浓度标准管和空白管只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立：以 0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05 $\mu\text{mol/mL}$ 为横坐标 (x)，对应的 ΔA 标准为纵坐标 (y)，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 ΔA 测定代入方程中得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)。

3.Fd-谷氨酸合成酶（Fd-GOGAT）活性计算

①按组织蛋白浓度计算

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

$$\text{Fd-GOGAT (U/mg prot)} = \frac{x \times V_{\text{酶促}} \times 10^3}{C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{166.67 \times x}{C_{\text{pr}}}$$

②按组织样本质量计算

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

$$\text{Fd-GOGAT (U/g)} = \frac{x \times V_{\text{酶促}} \times V_{\text{样总}} \times 10^3}{W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{166.67 \times x}{W}$$

注释： V 酶促：酶促反应体系总体积，0.25 mL；V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.05 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；Cpr：粗酶液蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：酶促反应时间，30 min；10³：单位换算系数，1 μmol=10³ nmol。

四、注意事项

①粗酶液应置于冰上待测，建议提取完成后当天完成活性检测；

②若A测定超出标准吸光值线性范围：高于最高值建议将粗酶液使用蒸馏水适当稀释后再进行测定，低于最低值建议适当延长酶促反应时间（30℃准确反应30 min，可延长至2 h以上）或制备更高浓度的粗酶液后再进行测定，计算时相应修改；

③准确在规定时间点完成吸光值测定，以确保检测结果的准确性和重复性；若样本较多可分批进行检测，以确保组间反应时间一致；

④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取2-3个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Liaodong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

