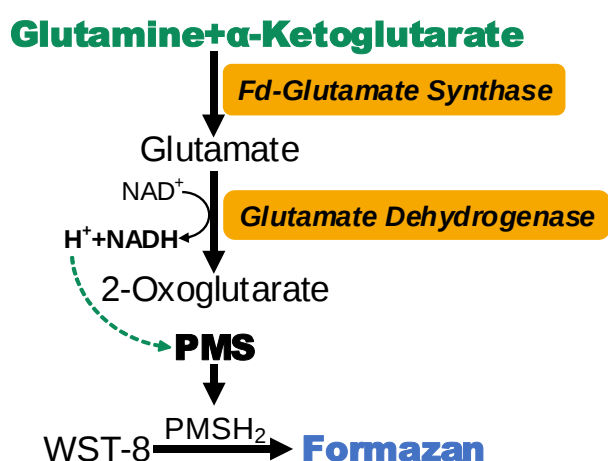




Fd-谷氨酸合成酶（Fd-GOGAT）活性检测试剂盒
Ferredoxin-Glutamate Synthase (Fd-GOGAT) Activity Assay Kit



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，同时生成还原 NAD 生成 NADH，NADH 在 1-mPMS 的作用下使 WST-8 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 100 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	粉剂×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 12 mL 试剂六充分溶解 (配制后 4°C 可保存一个月)
试剂二	液体 6 mL×1 瓶	4°C 避光保存	-
试剂三	粉剂×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 5 mL 蒸馏水充分溶解 (配制后 4°C 可保存一个月)
试剂四	粉剂×1 瓶	-20°C 保存	使用前加入 20 mL 试剂六充分溶解 (分装后 -20°C 可保存一个月，避免反复冻融)
试剂五	液体 3 mL×1 瓶	4°C 避光保存	-
试剂六	液体 40 mL×1 瓶	4°C 保存	-

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿（光径 10 mm）/96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器、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，取上清置于冰上待测。

2.测定步骤

- ①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 450 nm，蒸馏水调零。
- ②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。
- ③在离心管中依次加入下列试剂：

试剂	测定管 (μL)	对照管 (μL)
试剂一	100	100
试剂二	50	50
充分混匀，30℃孵育 5 min		
粗酶液	50	50
试剂三	50	-
蒸馏水	-	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
检测工作液	180	180
充分混匀，25℃显色 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：将反应液置于 1 mL 玻璃比色皿中，测定 450 nm 处吸光值，记为 A 测定和 A 对照；计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。注：每个样品均需设一个对照管。

3.Fd-谷氨酸合成酶（Fd-GOGAT）活性计算

3.1 使用 96 孔板测定的计算公式（ $y=2.162x+0.0002$ ， $R^2=0.9998$ ）

- 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。

$$\text{Fd-GOGAT (U/mg prot)} = \frac{(\Delta A - 0.0002) \times V_{\text{反总}} \times 10^3}{2.162 \times C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{77.1 \times (\Delta A - 0.0002)}{C_{\text{pr}}}$$

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。

$$\text{Fd-GOGAT (U/g)} = \frac{(\Delta A - 0.0002) \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^3}{2.162 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{77.1 \times (\Delta A - 0.0002)}{W}$$

3.2 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式 ($y=4.324x+0.0002$, $R^2=0.9998$)

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。

$$\text{Fd-GOGAT (U/mg prot)} = \frac{(\Delta A - 0.0002) \times V_{\text{反总}} \times 10^3}{4.324 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{38.54 \times (\Delta A - 0.0002)}{\text{Cpr}}$$

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。

$$\text{Fd-GOGAT (U/g)} = \frac{(\Delta A - 0.0002) \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^3}{4.324 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{38.54 \times (\Delta A - 0.0002)}{W}$$

注释： 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；V 反总：反应体系总体积，0.25 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；T：反应时间，30 min； 10^3 ：单位换算系数， $1 \mu\text{mol}=10^3 \text{ nmol}$ 。

四、注意事项

①测定过程中粗酶液应保持冰上放置，以免变性和失活；

②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.

