



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyyssw@sina.com

Fd-谷氨酸合成酶(Fd-GOGAT)活性检测试剂盒 分光法

货号: R32264

规格: 24T

保存温度: -20℃保存, 有效期 3 个月。

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℃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 4mL 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 4mL 的提取液充分溶解, 仍 4℃保存。
试剂三	液体 4mL×1	4℃保存	



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

	支		
试剂四	液体 4mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	液体 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	液体 1mL×1 棕色管	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！

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) 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：

(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) 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：

1. 可见分光光度计预热 30min，设定波长到 450nm，蒸馏水调零。



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyyssw@sina.com

2. 所有试剂解冻至室温（25℃），在离心管中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	70	70
试剂二	70	70
试剂三	70	70
混匀，30℃孵育 5 分钟		
样本	140	140
蒸馏水	-	140
试剂四	140	-
混匀，30℃反应 20min（准确时间），立即于 95℃沸水中水浴 1.5 分钟后，上下振动几下混匀后，12000rpm 离心 10 分钟，上清液待测。		

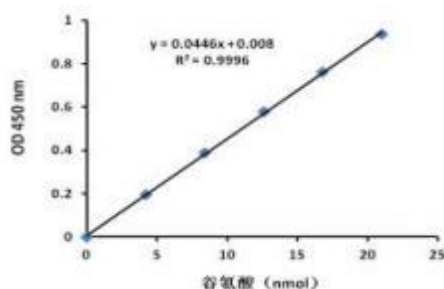
3. 显色反应：在离心管中依次加入

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
提取液	370	370
试剂五	80	80
试剂六	20	20
上清液	210	210
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】：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 300μL，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 20min 增加至 40min），则改变后的反应时间 T 需代入计算公式重新计算。

三、含量计算

1. 标准曲线方程： $y = 0.0446x + 0.008$ ；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。

$$\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/min/mg prot}) = [(\Delta A - 0.008) \div 0.0446] \times (V2 \div V3) \div (V1 \times \text{Cpr})$$
$$\div T = 18.7 \times (\Delta A - 0.008) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/min/g 鲜重}) = [(\Delta A - 0.008) \div 0.0446] \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V)$$
$$\div T = 18.7 \times (\Delta A - 0.008) \div W$$

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。

$$\text{Fd-GOGAT}(\text{nmol Glu/min}/10^4\text{cell})$$
$$= [(\Delta A - 0.008) \div 0.0446] \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.0374 \times (\Delta A - 0.008)$$

V--提取液体积, 1 mL

V1--加入样本体积, 0.14mL

V2--反应总体积, 0.49mL

V3--显色阶段上清液体积, 0.21mL

T--反应时间, 本实验中是 20min

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:



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

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。

