

谷氨酰胺合成酶(GS)活性检测试剂盒说明书

Glutamine Synthetase Assay Kit

微量法

货号: AK081

规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES12	60ml×1 瓶	4℃ 保存;
AK081-A	10mL×1 瓶	-20℃ 保存;
AK081-B	10mL×1 支	-20℃ 保存;
AK081-C	粉剂×2 支	-20℃ 保存; 用时每瓶加入 5mL 蒸馏水充分溶解备用, 剩余试剂-20℃可保存 4 周;
AK081-D	15mL×1 瓶	4℃ 保存;

简介:

意义: 谷氨酰胺合成酶 (Glutamine Synthetase, GS) (EC 6.3.1.2) 主要存在于植物中, 是生物体内氮同化的关键酶之一, 催化铵离子和谷氨酸合成谷氨酰胺, 不仅可以防止过多的铵离子对生物有毒性, 而且谷氨酰胺也是氮的主要储存和运输形式。

原理: 谷氨酰胺合成酶 (GS) 在 ATP 和 Mg^{2+} 存在下, 催化铵离子和谷氨酸合成谷氨酰胺; 谷氨酰胺进一步转化为 γ -谷氨酰基异羟肟酸, 在酸性条件下与铁形成红色的络合物; 该络合物在 540nm 处有最大吸收峰。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、水浴锅、可调式移液枪、研钵、冰和双蒸水。

粗酶液提取:

1. 细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液 ES12), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 组织: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液 ES12, 进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
3. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 分光光度计用蒸馏水调零。
2. 样本测定, 在 EP 管中加入下列试剂:

试剂名称	测定管 (ul)	对照管 (ul)
AK081-A	160	
AK081-B		160
AK081-C	70	70
样本	70	70
混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 准确水浴 30min		
AK081-D	100	100

混匀，静置 10min 后，8000g，常温离心 10min，取 200 μ L 上清液至微量石英比色皿或 96 孔板中，测定 540nm 处的吸光值 A。 $\Delta A=A$ 测定管-A 对照管。每个测定管需设一个对照管。

GS 活力单位的计算：

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 血清（浆）GS 活性

单位定义：每 mL 血清（浆）在每 mL 反应体系中每 min 使 540 下吸光值变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

计算公式： $GS (U/mL) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.01 \div T = 19 \times \Delta A$

2. 组织、细菌或细胞 GS 活性

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中每 min 使 540nm 下吸光值变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

计算公式： $GS (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div 0.01 \div T = 19 \times \Delta A \div Cpr$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织在每 mL 反应体系中每 min 使 540nm 下吸光值变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

计算公式： $GS (U/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 19 \times \Delta A \div W$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细菌或细胞在每 mL 反应体系中每 min 使 540nm 下吸光值变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

计算公式： $GS (U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.01 \div T = 0.038 \times \Delta A$

注： $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.4mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.07mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； T ：反应时间，30 min； Cpr ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量(g)；500：细菌或细胞总数，500 万。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 血清（浆）GS 活性

单位定义：每 mL 血清（浆）在每 mL 反应体系中每 min 使 540 下吸光值变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

计算公式： $GS (U/mL) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div 0.005 \div T = 38 \times \Delta A$

2. 组织、细菌或细胞 GS 活性

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中每 min 使 540nm 下吸光值变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

计算公式： $GS (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div 0.005 \div T = 38 \times \Delta A \div Cpr$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织在每 mL 反应体系中每 min 使 540nm 下吸光值变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

计算公式： $GS (U/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 38 \times \Delta A \div W$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位定义：每 1 万个细菌或细胞在每 mL 反应体系中每 min 使 540nm 下吸光值变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

计算公式： $GS (U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 0.076 \times \Delta A$

注： $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.4mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.07mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； T ：反应时间，30 min； Cpr ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量(g)；500：细菌或细胞总数，500 万。