

谷氨酰胺合成酶 (GS) 活性检测试剂盒 (微量法)
(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

| 产品编号 | 产品名称 | 产品规格 |
|---------|----------------------------|------------|
| YFX0202 | 谷氨酰胺合成酶 (GS) 活性检测试剂盒 (微量法) | 100 管/48 样 |

产品内容

| 名称 | 规格 | 储存条件 |
|-----|---------------------------------------------------------|------|
| 提取液 | 液体 100mL | 4℃ |
| 试剂一 | 液体 10mL: 临用前 37℃ 预热 20min, 充分混匀, 如有沉淀, 静置 10min, 取上清待用。 | -20℃ |
| 试剂二 | 液体 10mL: 临用前 37℃ 预热 20min, 充分混匀, 如有沉淀, 静置 10min, 取上清待用。 | -20℃ |
| 试剂三 | 粉剂×2 瓶: 用时每瓶加入 5mL 蒸馏水充分溶解待用。 | -20℃ |
| 试剂四 | 液体 15mL | 4℃ |

一、产品说明

谷氨酰胺合成酶 (GLutamine synthetase, GS) (EC 6.3.1.2) 主要存在于植物中, 是生物体内氨同化的关键酶之一, 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, 而且谷氨酰胺也是氨的主要储存和运输形式。

GS 在 ATP 和 Mg²⁺ 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, 在酸性条件下形成的络合物在 540nm 处有最大吸收峰, 可用分光光度计测定。

二、自备材料

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

三、样品准备

- 1、组织: 按照组织质量 (g) : 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 2、细胞/细菌: 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 (10⁴ 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), 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。
- 3、血浆/血清: 直接检测。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。
- 2、在 EP 管中一次加入:

| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 试剂一 | 160 | |
| 试剂二 | | 160 |
| 试剂三 | 70 | 70 |
| 样本 | 70 | 70 |
| 混匀, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其他物种) 准确水浴 30min。 | | |
| 试剂四 | 100 | 100 |
| 混匀, 25°C 室温静置 10min 后, 8000g, 25°C 离心 10min, 取 200μL 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。ΔA=A 测定管-A 对照管。每个测定管需设一个对照管。 | | |

五、活性的计算

A. 用 96 孔板测定的计算公式如下:

标准曲线公式: $y = 0.4174x + 0.0008$, $R^2 = 0.9999$ 。

1、按照组织蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中每小时产生 1μmol γ-谷氨酰基异羟肟酸定义为一个酶活力单位。

GS (μmol/h/mg prot) = $(\Delta A - 0.0008) \div 0.4174 \times V_{\text{反总}} \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 20.535 \times \Delta A \div Cpr$ 。

2、按照样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织在每 mL 反应体系中每小时产生 1μmol γ-谷氨酰基异羟肟酸定义为一个酶活力单位。

GS (μmol/h/g 鲜重) = $(\Delta A - 0.0008) \div 0.4174 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 20.535 \times \Delta A \div W$ 。

3、按照细菌/细胞密度计算

单位定义: 每 1 万个细菌或细胞在每 mL 反应体系中每小时产生 1μmol γ-谷氨酰基异羟肟酸定义为一个酶活力单位。

GS (μmol/h/10⁴ ceLL) = $(\Delta A - 0.0008) \div 0.4174 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.041 \times \Delta A$ 。

4、按照血清/血浆体积计算

单位定义: 每 mL 血清 (浆) 在每 mL 反应体系中每小时产生 1μmol γ-谷氨酰基异羟肟酸定义为一个酶活力单位。

GS (μmol/h/mL) = $(\Delta A - 0.0008) \div 0.4174 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 20.535 \times \Delta A$ 。

V 反总: 反应体系总体积, 0.3mL; V 样: 加入样本体积, 0.07mL; V 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. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

标准曲线公式: $y = 0.8348x + 0.0008$, $R^2 = 0.9999$ 。

1、按照组织蛋白浓度计算

单位的定义: 每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中每小时产生 1μmol γ-谷氨酰基异羟肟酸定义为一个酶活力单位。

GS (μmol/h/mg prot) = $(\Delta A - 0.0008) \div 0.8348 \times V_{\text{反总}} \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 10.268 \times \Delta A \div Cpr$ 。

2、按照样本鲜重计算

单位的定义: 每 g 组织在每 mL 反应体系中每小时产生 1 μ mol γ -谷氨酰基异羟肟酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{GS } (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = (\Delta\text{A}-0.0008) \div 0.8348 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 10.268 \times \Delta\text{A} \div W。$$

3、按照细菌/细胞密度计算

单位定义: 每 1 万个细菌或细胞在每 mL 反应体系中每小时产生 1 μ mol γ -谷氨酰基异羟肟酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{GS } (\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ ceLL}) = (\Delta\text{A}-0.0008) \div 0.8348 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ = 0.021 \times \Delta\text{A}。$$

4、按照血清/血浆体积计算

单位定义: 每 mL 血清 (浆) 在每 mL 反应体系中每小时产生 1 μ mol γ -谷氨酰基异羟肟酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{GS } (\mu\text{mol/h/mL}) = (\Delta\text{A}-0.0008) \div 0.8348 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T = 10.268 \times \Delta\text{A}。$$

V 反总: 反应体系总体积, 0.3mL; V 样: 加入样本体积, 0.07mL; V 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。