

谷氨酰胺合成酶 (GS) 活性检测试剂盒 (分光光度计法)
(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
YFX0201	谷氨酰胺合成酶 (GS) 活性检测试剂盒	50 管/24 样

产品内容

名称	规格	储存条件
提取液	液体 30mL × 1 瓶	4℃
试剂一	液体 12mL × 1 瓶: 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 12mL × 1 瓶: 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 × 1 瓶	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, 而且谷氨酰胺也是氨的主要储存和运输形式。

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、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、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: 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), 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、血清/血浆: 直接测定。

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、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 蒸馏水调零。
- 2、在 1.5mL 离心管依次操作:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	400	
试剂二		400
试剂三	175	175
样本	175	175
混匀, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其他物种) 准确水浴 30min。		
试剂四	250	250
混匀, 25°C 室温静置10min后, 5000g, 25°C 离心10min, 取上清液测定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、GS 活性的计算

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

1、按照样本蛋白浓度计算:

单位定义: 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。

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

2、按照样本鲜重计算:

单位定义: 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。

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

3、按照细胞数量计算:

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。

$GS (\mu\text{mol/h/104 ceLL}) = (\Delta A - 0.0008) \div 0.8348 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.021 \times \Delta A$ 。

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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 0.75mL; V 样: 加入样本体积, 0.175mL; 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。