

规格：100 管/48 样

谷氨酰胺合成酶（Glutamine synthetase, GS）试剂盒说明书

微量法

产品内容：

提取液：100mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：10mL×1 瓶，-20℃ 保存。

试剂二：10mL×1 瓶，-20℃ 保存。

试剂三：粉剂×2 瓶，-20℃ 保存。用时每瓶加入5mL蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂仍-20℃ 保存。

试剂四：15mL×1 瓶，4℃ 保存。

产品说明：

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，在酸性条件下与铁形成红色的络合物；该络合物在540nm 处有最大吸收峰，可用分光光度计测定。

所需的仪器和用品：

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本测定的准备

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

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(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。

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、血清（浆）样品：直接检测。

二、测定步骤

1、分光光度计预热30min 以上，调节波长至540nm，蒸馏水调零。

2、在EP 管中加入下列试剂：

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℃ (哺乳动物) 或25℃ (其他物种) 准确水浴30min		
试剂四	100	100

混匀, 静置10min后, 8000g, 常温离心10min, 取200 μL上清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。

GS 活力单位的计算

a. 用微量石英比色皿测定计算公式如下:

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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 0.4mL; 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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

$V_{反总}$ ：反应体系总体积，0.4mL； $V_{样}$ ：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； C_{pr} ：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。