

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

分光光度法 50管/24样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

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。

测定原理:

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。

组成:

产品名称	AC001-50T/24S	Storage
提取液	30ml	4°C
试剂一: 液体	12ml	-20°C
试剂二: 液体	12ml	-20°C
试剂三: 粉剂	2 瓶	-20°C
试剂四: 液体	15ml	4°C
说明书	1 份	

试剂一临用前 37°C 预热 20min, 充分混匀, 如有沉淀, 静置 10min, 取上清待用。

试剂二临用前 37°C 预热 20min, 充分混匀, 如有沉淀, 静置 10min, 取上清待用。

试剂三用时每瓶加入 5ml 蒸馏水充分溶解待用。

自备仪器和用品:

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

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 (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°C 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°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、血清 (浆) 样品: 直接检测。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



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	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。

GS 活力单位的计算:

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

1、血清 (浆) GS 活性

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

计算公式:

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

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。

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

(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。

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

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。

