

谷氨酰胺合成酶(GS)活性检测试剂盒说明书

Glutamine Synthetase Assay Kit

可见分光光度法

货号: AK080

规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES12	30ml×1 瓶	4℃ 保存;
AK080-A	10mL×1 瓶	-20℃ 保存;
AK080-B	10mL×1 支	-20℃ 保存;
AK080-C	粉剂×2 支	-20℃ 保存; 用时每瓶加入 5mL 蒸馏水充分溶解备用, 剩余试剂需-20℃分装保存。
AK080-D	10mL×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、1ml 玻璃比色皿、水浴锅、可调式移液枪、研钵、台式离心机、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; 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. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 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)
AK080-A	320	
AK080-B		320
AK080-C	140	140
样本	140	140
混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 准确水浴 30min		
AK080-D	200	200

混匀, 静置 10min 后, 5000g, 常温离心 10min, 取上清液测定 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：

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 nm 下吸光值变化0.01 定义为一个酶活力单位。

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

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。

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

注：V 反总：反应体系总体积，0.8mL；V 样：加入样本体积，0.14mL；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。

注意事项：

AK080-A、AK080-B 可能会有析出，可以重悬后使用，反应后取上清测定