

## 谷氨酰胺合成酶(GS)活性检测试剂盒说明书

### Glutamine Synthetase Assay Kit

微量法

货号: AK081

规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

| 编号       | 规格       | 储存条件                                            |
|----------|----------|-------------------------------------------------|
| 提取液 ES12 | 60ml×1 瓶 | 4℃ 保存;                                          |
| AK081-A  | 10mL×1 瓶 | -20℃ 保存;                                        |
| AK081-B  | 10mL×1 支 | -20℃ 保存;                                        |
| AK081-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-20℃可保存 4 周; |
| AK081-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  $\gamma$ -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/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、水浴锅、可调式移液枪、研钵、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; 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 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. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm, 分光光度计用蒸馏水调零。
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) |
|----------------------------------------|----------|----------|
| AK081-A                                | 160      |          |
| AK081-B                                |          | 160      |
| AK081-C                                | 70       | 70       |
| 样本                                     | 70       | 70       |
| 混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其他物种) 准确水浴 30min |          |          |
| AK081-D                                | 100      | 100      |

混匀，静置 10min 后，8000g，常温离心 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。△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：**

**a. 用微量石英比色皿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 0.01 定义为一个酶活力单位。

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。

计算公式：GS (U/mg 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。

计算公式：GS (U/g 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。

计算公式：GS (U/10<sup>4</sup> 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，0.4mL；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。

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。

计算公式：GS (U/mg 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。

计算公式：GS (U/g 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。

计算公式：GS (U/10<sup>4</sup> cell) =  $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div 0.005 \div T = 0.076 \times \Delta A$

**注：** 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。

**注意事项：**

AK081-A、AK081-B 可能会有析出，可以重悬后使用，反应后取上清测定。