

谷氨酰胺合成酶 (GS) 测定试剂盒说明书(精简版)

(货号: A047-1-1)

比色法 24T)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书, 测试后再进行批量实验, 否则由此导致的后果用户自行承担!

个酶活力单位。

一、测定意义

谷氨酰胺合成酶 (Glutamine synthetase, GS) 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的毒性, 而且谷氨酰胺也是氮的主要储存和运输形式。

二、测定原理

GS 在 ATP 和 Mg^{2+} 的存在下, 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其吸光值来判定 GS 的活力。

三、所用仪器与耗材

含 540nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿、37℃ 水浴锅或恒温箱、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、涡旋混匀器、试管或离心管、蛋白测定试剂 (组织及细胞样本用, 本公司有售)。

四、试剂组成和配置 (试剂盒有效期 3 个月)

提取液: 30mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂一: 12mL×1 瓶, -20℃ 保存。使用时 37℃ 预热 20min, 充分混匀, 如有沉淀, 静置 10min, 取上清待用。

试剂二: 12mL×1 瓶, -20℃ 保存。使用时 37℃ 预热 20min, 充分混匀, 如有沉淀, 静置 10min, 取上清待用。

试剂三: 粉剂×2 瓶, -20℃ 保存。使用时每瓶粉剂加入 5mL 蒸馏水充分溶解待用。

试剂四: 15mL×1 瓶, 4℃ 保存。

五、样本前处理

1、组织: 按照组织重量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1:10 的比例混合后, 冰水浴匀浆, 4000 转/min 离心 10min, 取上清置冰上待测。

2、血清 (浆): 直接取样测定。

3、细胞、细菌或组织样品: 收集细胞或细菌于离心管中, 离心后弃上清, 按照细胞或细菌数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500: 1 的比例混合, 超声波破碎细胞或细菌 (条件: 冰浴、功率 20% 或 200W、超声 3s、间隔 10s、重复 30 次) 后待测。

六、测定步骤

| | 测定管 | 对照管 |
|---|-----|-----|
| 待测样本 (μ L) | 175 | 175 |
| 试剂一 (μ L) | 400 | |
| 试剂二 (μ L) | | 400 |
| 试剂三 (μ L) | 175 | 175 |
| 混匀, 37℃ (动物) 或 25℃ (其他物种) 反应 30min | | |
| 试剂四 (μ L) | 250 | 250 |
| 混匀, 室温静置 10min, 4000 转/min 离心 10min, 取上清在 540nm 处, 1cm 光径比色皿, 蒸馏水调零, 测各管 OD 值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ | | |

注: 在进行正式实验前最好取 1-2 个样本上清进行预试, 以便确定样本最佳取样浓度。

七、计算方法

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

1、血清 (浆) 计算方法

单位定义: 每 mL 血清 (浆) 在每 mL 反应体系中每小时产生 $1\mu\text{mol}$ 的 γ -谷氨酰基异羟肟酸为一

计算公式:

$$\text{血清 (浆) 中 GS 活力} = \frac{\Delta A - 0.0008}{0.8348} \times V_{\text{反应}} \div V_{\text{样}} \div T$$

($\mu\text{mol/h/mL}$)

2、组织、细菌、细胞计算方法

(1)、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中每小时产生 $1\mu\text{mol}$ 的 γ -谷氨酰基异羟肟酸为一个酶活力单位。

计算公式:

$$\text{组织、细胞、细菌中 GS 活力} = \frac{\Delta A - 0.0008}{0.8348} \times V_{\text{反应}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T$$

($\mu\text{mol/h/mg prot}$)

(2)、按样本鲜重计算:

单位定义: 每 g 组织在每 mL 反应体系中每小时产生 $1\mu\text{mol}$ 的 γ -谷氨酰基异羟肟酸为一个酶活力单位。

计算公式:

$$\text{组织、细胞、细菌中 GS 活力} = \frac{\Delta A - 0.0008}{0.8348} \times V_{\text{反应}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

($\mu\text{mol/h/g}$)

(3)、按细菌或细胞密度计算:

单位定义: 每 1 万个细胞或细菌在每 mL 反应体系中每小时产生 $1\mu\text{mol}$ 的 γ -谷氨酰基异羟肟酸为一个酶活力单位。

计算公式:

$$\text{细胞或细菌中 GS 活力} = \frac{\Delta A - 0.0008}{0.8348} \times V_{\text{反应}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

($\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}$)

$V_{\text{反应}}$: 反应液总体积, 0.75mL;

$V_{\text{样}}$: 取样量, 0.175mL;

T: 反应时间, 0.5h;

Cpr: 样本蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白);

W: 样本质量, g;

$V_{\text{样总}}$: 提取液总体积;

500: 细胞数, 万个。