

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0377

Size: 100T/96S

谷氨酰胺合成酶 (GS) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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，在酸性条件下与铁形成红色的络合物；该络合物在 540nm 处有最大吸收峰。

三、需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 60mL × 1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 10mL × 1 瓶	-20℃ 保存	
试剂二	液体 10mL × 1 瓶	-20℃ 保存	
试剂三	粉剂 × 2 瓶	-20℃ 保存	用时每瓶加入 5mL 双蒸水充分溶解备用, 用不完的试剂仍-20℃分装保存。
试剂四	液体 15mL × 1 瓶	4℃ 保存	

五、操作步骤：

● 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℃ 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。

● 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，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°C（哺乳动物）或 25°C（其他物种）准确水浴 30min		
试剂四	100	100

混匀，静置 10min 后，5000g，常温离心 10min，取 200μL 上清液至微量玻璃比色皿或 96 孔板中，测定 540nm 处的吸光值 A。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

六、GS 活力单位的计算

1. 用微量玻璃比色皿测定的计算公式如下

(1) 按血清（浆）体积计算

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) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每 min 使 540nm 下吸光值变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

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

(3) 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每 min 使 540nm 下吸光值变化 0.01 定义为一个酶活力单位。

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

(4) 按细菌或细胞数量计算

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，400 μ L=0.4mL；V 样：加入样本体积，70 μ L=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：样品质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

2. 用96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按血清（浆）体积计算

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。

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

(2) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每 min 使 540nm 下吸光值变化 0.005 定义为一个酶活力单位。GS (U/mg prot) = $\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div 0.005 \div T = 38 \times \Delta A \div Cpr$

(3) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每 min 使 540nm 下吸光值变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

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

(4) 按细菌或细胞数量计算

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。

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

V 反总：反应体系总体积，400 μ L=0.4mL；V 样：加入样本体积，70 μ L=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：样品质量，g； 500：细菌或细胞总数，500 万。

七、注意事项：

试剂一、试剂二可能会有析出，可以重悬后使用，反应后取上清测定。