

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

谷氨酰胺合成酶 (GS) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	30mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	10mL×1 瓶	-20℃保存	-
试剂二	10mL×1 瓶	-20℃保存	-
试剂三	粉剂×2 瓶	-20℃保存	用时每瓶加入5mL蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂仍-20℃保存。
试剂四	10mL×1 瓶	4℃保存	-

产品说明：

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。

GS在ATP和Mg²⁺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，可用分光光度计测定。

所需的仪器和用品：

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。

操作步骤：

一、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（10⁴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。

二、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。

在EP管中加入下列试剂：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂一	320	
试剂二		320
试剂三	140	140
样本	140	140
混匀，37°C (哺乳动物) 或25°C (其他物种) 准确水浴30min		
试剂四	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。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

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540nm下吸光值变化0.01定义为一个酶活力单位。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

V反总：反应体系总体积，0.8mL；V样：加入样本体积，0.14mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，30min；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。