

谷氨酰胺合成酶(GS)试剂盒说明书

(货号: ADS-W-N008 微板法 48 样)

有效期: 3 个月

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。

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, 可用分光光度计测定。

所需的仪器和用品

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

试剂的组成和配制

提取液: 液体 100mL×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℃ 保存。

试剂四: 15mL×1 瓶, 4℃ 避光保存。

样本测定的准备

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 (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。

2. 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。

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℃ (哺乳动物) 或 25℃ (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 上清液至微量石英比色皿或 96 孔板中, 测定 540nm 处的吸光值 A。ΔA=A 测定管-A 对照管。

GS 活力单位的计算

(1) 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。

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

(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。

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

(3) 按细菌、细胞个数计算

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

V 反总：反应体系总体积，400 μ L； V 样：加入样本体积，70 μ L； 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。