

谷氨酰胺合成酶 (Glutamine synthetase, GS) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-N008 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

谷氨酰胺合成酶 (GS, EC 6.3.1.2) 主要存在于植物中, 是生物体内氨同化的关键酶之一, 植物吸收的无机氮经硝酸还原酶 (NR) 和亚硝酸还原酶 (NIR) 还原成 NH_4^+ 后, 通过谷氨酰胺合成酶 (GS) 参与的 GS/GOGAT 途径才能进行氮素的同化和利用。

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 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, 进而得到谷氨酰胺合成酶 (GS) 的酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 18mL×1 瓶	4℃保存	1. 临用前 37℃预热 10min, 充分混匀; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 17mL×1 瓶	4℃保存	1. 临用前 37℃预热 10min, 充分混匀; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉剂 2 瓶	-20℃保存	1. mg 级, 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 每瓶再加入 7mL 蒸馏水充分溶解待用, 仍-20℃保存。
试剂四	液体 25mL×1 瓶	4℃避光保存	

[注]: 粉剂量在 mg 级别, 使用前用手甩几次或者进行离心, 打开直接加入要求的试剂即可。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌/细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 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), 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例提取。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 540nm。

② 在 EP 管中依次加入:

试剂 (μL)	测定管	对照管
样本	200	200
试剂一		320
试剂二	320	
试剂三	120	120
混匀, 37°C水浴 30min		
试剂四	200	200
混匀, 反应 2min, 8000rpm, 4°C离心 10min, 取 200μL 上清液于 96 孔板中, 540nm 处分别读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ (每个测定管须设一个对应的对照管)。		

【注】: 若 ΔA 值低于 0.005, 可增加样本加样体积 V1 (如由 200μL 增至 400μL, 则试剂一和试剂二相应减少 120μL, 试剂三相应减少 80μL), 保持反应总体积不变。或增加样本取样质量 W (由 0.1g 增加到 0.2g 或更高)。则改变后的 V1 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克组织蛋白在每分钟内使 A540 吸光值变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$GS(U/mg \text{ prot}) = \Delta A \div (Cpr \times V1) \div 0.005 \div T = 33.3 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织在每分钟内使 A540 吸光值变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$GS(U/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 0.005 \div T = 33.3 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌或细胞密度计算:

单位定义: 每百万细菌或细胞在每分钟内使 A540 吸光值变化 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$GS(U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div 0.005 \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.07 \times \Delta A$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.2mL;

T---反应时间, 30 min;

W---样本质量, g;

500---细胞数量, 万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。