

组织及血液谷氨酰胺合成酶（GS）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHB1-M48	组织及血液谷氨酰胺合成酶（GS）试剂盒	48T	微量法

产品说明：

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，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，而且谷氨酰胺也是氨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。

试剂组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	-20℃ 保存
试剂二	液体 10 mL×1 瓶	-20℃ 保存
试剂三	粉剂×2 瓶	-20℃ 保存
试剂四	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃ 保存

溶液的配制：

试剂三：临用前取一瓶加入5mL 蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂-20℃分装可保存4 周，避免反复冻融。

操作步骤：

一、样本处理

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（若溶液呈现浑浊，则离心取上清后再测定）。

二、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，分光光度计用蒸馏水调零。

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。ΔA=A 测定-A 对照。每个测定管需设一个对照管。

三、GS活力单位的计算

A、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 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。

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

3. 按样本质量计算:

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。

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

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, 400μL=0.4mL; V样: 加入样本体积, 70μL=0.07mL; 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。

B、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。

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

3、按样本质量计算:

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。

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

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，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。