

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

（货号：G0401F48 分光法 48 样）

### 一、产品简介：

谷氨酰胺合成酶（GS，EC 6.3.1.2）主要存在于植物中，是生物体内氮同化的关键酶之一，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  $\text{NH}_4^+$  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  $\text{Mg}^{2+}$  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  $\gamma$ -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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉体 mg×2 瓶	4°C 保存	用前甩几下使粉体落入底部，每瓶加 18mL 的试剂五充分溶解（立即取出 9mL 已溶好的试剂一液体至一瓶试剂二中，则余 9mL 试剂一液体备用）。若已溶好的试剂一液体存放一段时间后沉淀析出，可先 37°C 预热 10min 后取上清液直接检测即可。
试剂二	粉体 mg×2 瓶	4°C 保存	用前甩几下使粉体落入底部，取 9mL 已经溶解好的试剂一溶液至一瓶试剂二中混匀溶解备用。
试剂三	粉剂 mg×2 瓶	-20°C 保存	用前甩几下使试剂落入底部，每瓶再加入 7mL 蒸馏水充分溶解待用，仍 -20°C 保存。
试剂四	液体 24mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂五	液体 40mL×1 瓶	4°C 保存	

### 三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、谷氨酰胺合成酶（GS）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

##### 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°C 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°C 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（ $10^4$  个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例提取。

## 2、上机检测：

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 540nm，蒸馏水调零。
- 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，全部上清液转移至 1ml 玻璃比色皿中，于 540nm 处分别读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个测定管须设一个对应的对照管）。		

**【注】：**若 $\Delta A$ 值低于 0.01，可增加样本加样体积 V1（如由 200μL 增至 400μL，则试剂一和试剂二分别相应减少 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 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$GS(U/mg \text{ prot}) = \Delta A \div (Cpr \times V1) \div 0.01 \div T = 16.7 \times \Delta A \div Cpr$$

### 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 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$GS(U/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 0.01 \div T = 16.7 \times \Delta A \div W$$

### 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 0.01 定义为一个酶活力单位。

$$GS(U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div 0.01 \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.033 \times \Delta A$$

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。