

6-磷酸葡萄糖胺合成酶试剂盒说明书

(货号: G0558F 分光法 24 样)

一、产品简介:

6-磷酸葡萄糖胺合成酶(GlmS, EC 2.6.1.16)又名 6-磷酸果糖谷氨酰胺氨基转移酶(GFAT), 是氨基己糖合成代谢途径中第一步反应的催化酶, 也是限速酶, 该代谢途径的最终产物鸟苷乙酰葡萄糖胺是生命体糖蛋白的前体和一些真菌细胞壁主要成分几丁质的合成单体。

6-磷酸葡萄糖胺合成酶(GlmS)催化谷氨酰胺和 6-磷酸果糖合成 6-磷酸葡萄糖胺和谷氨酸, 本试剂盒通过检测生成谷氨酸的速率进而计算出该酶活性的大小。

反应方程: L-glutamine + D-fructose 6-phosphate = L-glutamate + D-glucosamine 6-phosphate。

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 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	临用前甩几下, 使粉体落到底部, 再加入 1.2mL 蒸馏水溶解备用
试剂二	液体 40mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	临用前甩几下, 使粉体落到底部, 再加入 2.4mL 蒸馏水溶解备用
试剂四	液体 1mL×1 支	4℃ 保存	
试剂五	粉体 mg×1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下, 使粉体落到底部, 再加入 2.2mL 蒸馏水溶解备用
标准品	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该标曲。

三、所需的仪器和用品:

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

四、6-磷酸葡萄糖胺合成酶活性检测:

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:

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 的比例提取

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 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); 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(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温(25℃), 在 EP 管中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管	对照管
样本	240	240

试剂一	30	
试剂二	330	360
混匀, 37°C 反应 30min (准确时间), 立即于 95°C 沸水中水浴 3 分钟后, 上下振动几下混匀后, 室温 8000rpm 离心 10min, 上清液待测。		

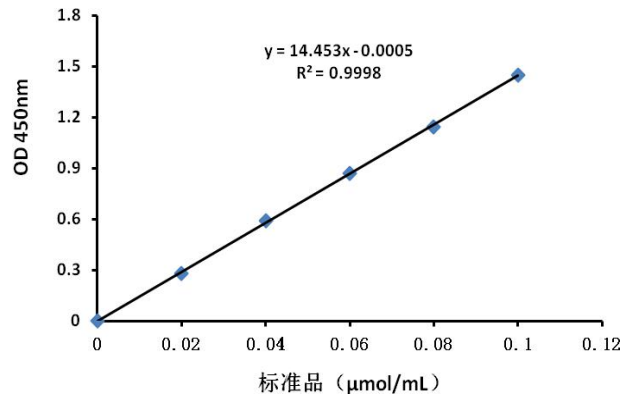
③ 显色反应: 在 EP 管中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂二	300	300
试剂三	40	40
试剂四	20	20
上清液	400	400
试剂五	40	40
混匀, 30°C 反应 30min, 全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中, 于 450nm 处读取各管吸光值 A (若反应未终止即吸光值还在上升, 须延长反应时间), $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$ (每个样本需做一个自身对照)。		

【注】若 ΔA 差值在零附近徘徊, 可在 37°C 反应阶段延长反应时间 T (如增至 1h), 或加大加样体积 V1 (如增至 300μL, 则试剂二相应减少), 或增加样本制备阶段取样质量 W (如增加到 0.2g) 则改变后的反应时间 T 或样本体积 V1 或 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程为 $y = 14.453x - 0.0005$, x 为谷氨酸摩尔浓度 (μmol/mL), y 为 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每小时生成 1 nmol 的谷氨酸定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GlmS (nmol/h/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0005) \div 14.453] \times V_2 \times 10^3 \div (V_1 \times C_{pr}) \div T \\ &= 346 \times (\Delta A + 0.0005) \div C_{pr} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每小时生成 1 nmol 的谷氨酸定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GlmS (nmol/h/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0005) \div 14.453] \times V_2 \times 10^3 \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 346 \times (\Delta A + 0.0005) \div W \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 每 10^4 个细胞每小时生成 1 nmol 的谷氨酸 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GlmS (nmol/h/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0005) \div 14.453] \times V_2 \times 10^3 \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.69 \times (\Delta A + 0.0018)$$

5、按照液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每小时生成 1 nmol 的谷氨酸 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GlmS (nmol/h/mL)} = [(\Delta A + 0.0005) \div 14.453] \times V_2 \times 10^3 \div V_1 \div T = 346 \times (\Delta A + 0.0005)$$

V--提取液体积, 1 mL; V1--加入样本体积, 0.24mL;

V2--反应总体积, 0.6mL; T--反应时间, 30min=0.5h; W--样本质量, g;

Cpr--样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司 BCA 蛋白含量测定试剂盒;

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (10 μ mol/mL): 标准品用 2mL 的蒸馏水溶解。(母液需在两天内用且-20 $^{\circ}$ C 保存)。
- 2 把母液稀释成六个梯度标准品: 0,0.02,0.04,0.06,0.08,0.1. μ mol/mL。也可根据实际样本来调整浓度。
- 3 依据显色反应阶段, 测定管的加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。