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

（货号：G0401W 微板法 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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 mg×2 瓶	4℃保存	用前甩几下使粉体落入底部，每瓶加 9mL 的试剂五充分溶解（**立即**取出 4.5mL 已溶好的试剂一液体至一瓶试剂二中，则余 4.5mL 试剂一液体备用）。若已溶好的试剂一液体存放一段时间后有沉淀析出，可先 37℃预热 10min 后取上清液直接检测即可。
试剂二	粉体 mg×2 瓶	4℃保存	用前甩几下使粉体落入底部，取 4.5mL 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℃保存	用前甩几下使试剂落入底部，每瓶再加入 3.5mL 蒸馏水充分溶解待用，仍-20℃保存。
试剂四	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、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℃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 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例提取。

2、 上机检测：

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	100	100
试剂一		160
试剂二	160	
试剂三	60	60
混匀，37℃水浴 30min		
试剂四	100	100
混匀，反应 2min，8000rpm，4℃离心 10min，取 200μL 上清液于 96 孔板中，540nm 处分别读取吸光值 A，△A=A 测定管-A 对照管（每个测定管须设一个对应的对照管）。		

【注】：若△A 值低于 0.005，可增加样本加样体积 V1（如由 100μL 增至 200μL，则试剂一和试剂二分别相应减少 60μL，试剂三相应减少 40μL），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 prot)=ΔA÷(Cpr×V1)÷0.005÷T=66.7×ΔA÷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 鲜重)=ΔA÷(W×V1÷V)÷0.005÷T=66.7×ΔA÷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 cell)=ΔA÷0.005÷(500×V1÷V)÷T=0.133×ΔA

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入样本体积，0.1mL；

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。