

Glutamine Synthetase Activity Assay Kit

谷氨酰胺合成酶（GS）试剂盒说明书

货号：G0401W96 | 方法：微板法 | 规格：96 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 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 120mL×1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂一 | 粉体 mg×2 瓶 | 4°C 保存 | 使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会有沉淀析出，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 | 使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 | 使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：

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°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（10⁴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°C水浴 30min | | |
| 试剂四 | 100 | 100 |
| 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）。 | | |

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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。

$$GS(U/mg \text{ prot}) = \Delta A \div (Cpr \times V1) \div 0.005 \div T = 66.7 \times \Delta A \div Cpr$$

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 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$GS(U/g \text{ 鲜重}) = \Delta A \div (W \times V1 \div V) \div 0.005 \div T = 66.7 \times \Delta A \div W$$

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 0.005 定义为一个酶活力单位。

$$GS(U/10^4 \text{ cell}) = \Delta A \div 0.005 \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.133 \times \Delta A$$

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。