谷氨酰胺合成酶活性检测试剂盒说明书

规格：48 样　　方法：酶标仪法

一、注意事项

1. 使用前请通读一遍说明书再开始实验。

2. 正式检测前选取 2~3 个样本进行预检测。

3. 本试剂盒仅用于科研。

二、产品组分

试剂名称	试剂规格	保存条件	备注
提取液	55 mL×1	4℃	
试剂一	8.5 mL×1	-20℃	临用前 37℃预热 20 min，充分混匀，如有沉淀，静置 10 min，取上清待用。
试剂二	8.5 mL×1	-20℃	临用前 37℃预热 20 min，充分混匀，如有沉淀，静置 10 min，取上清待用。
试剂三	粉剂×2	-20℃	用时每瓶加入 5 mL 蒸馏水充分溶解待用。
试剂四	11 mL×1	4℃	

三、仪器和用品

酶标仪、96 孔板、移液器、天平、可降温离心机、超纯水/蒸馏水、研磨仪/研钵、冰、水浴锅。

四、样品制备

1. 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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液），进行冰浴匀浆。8000 g，4℃离心 10 min，取上清，置冰上待测。

2. 细菌/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/细胞数量（10^4 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 1 mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次）；8000 g，4℃离心 10 min，取上清，置冰上待测。

3. 液体样本：澄清的液体的样本直接测定，若浑浊则离心后取上清液检测。

五、测定步骤

1.酶标仪预热 30 min 以上，波长调至 540 nm 处。

2.在 1.5 mL 离心管中依次加入：

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℃（哺乳动物）或 25℃（其他物种）准确水浴 30 min		
试剂四	100	100
混匀，25℃室温静置 10 min 后，8000 g，常温离心 10 min，取 200 μL 上清液至 96 孔板中，测定 540 nm 处的吸光值 A。ΔA=A 测定管-A 对照管。每个测定管需设一个对照管。		

六、计算

1. 标准方程

标准条件下测得回归方程为：y=0.4174x+0.0008，R^2=0.9999；x 为标准品浓度（nmol/mL），y 为吸光值ΔA。

2. 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织蛋白在每 mL 反应体系中每小时产生 1 μmol γ-谷氨酰基异羟肟酸定义为一个酶活力单位。

谷氨酰胺合成酶（nmo/g 鲜重）=（ΔA-0.0008）÷0.4174×V 反总÷（V 样÷V 样总×W）=20.535×（ΔA-0.0008）÷W

3. 按照蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在每 mL 反应体系中每小时产生 1 μmol γ-谷氨酰基异羟肟酸定义为一个酶活力单位。

谷氨酰胺合成酶（μmol/h/mg prot）=（ΔA-0.0008）÷0.4174×V 反总÷（Cpr×V 样）÷T=20.535×（ΔA-0.0008）÷Cpr

4. 按细菌/细胞数量计算

单位定义：每 1 万个细菌或细胞在每 mL 反应体系中每小时产生 1 μmol γ-谷氨酰

基异羟肟酸定义为一个酶活力单位。

谷氨酰胺合成酶（nmol/10^4 cell）=（ΔA+0.0011）÷0.4174×V 反总÷（V 样÷V 样总×N）÷T=20.535×（ΔA-0.0008）÷N

V 反总：反应体系总体积，0.3 mL；V 样：加入样本体积，0.07 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，30 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细菌或细胞总数，（万个）。

七、产品简介

谷氨酰胺合成酶是生物体内氨同化途径的关键酶，催化谷氨酸与氨结合生成谷氨酰胺，广泛存在于植物、微生物及动物组织中。主要功能是参与氮素的同化与再同化过程，调节细胞内氨的稳态平衡，在植物氮代谢调控、抗逆响应及作物产量形成中发挥重要作用，是评价氮素利用效率及氨解毒能力的重要酶学指标。