

6-磷酸葡萄糖胺合成酶试剂盒说明书

(货号: BP10283W 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉体 1 支	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.2mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 25mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	粉体 1 支	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.2mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 1mL×1 支	4℃ 避光保存	
试剂五	粉体 1 支	-20℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉体 1 支	4℃ 保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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（10⁴）：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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃），在 EP 管中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	对照管
样本	80	80
试剂一	10	
试剂二	110	120
混匀，37℃反应 30min（准确时间），立即于 95℃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。		

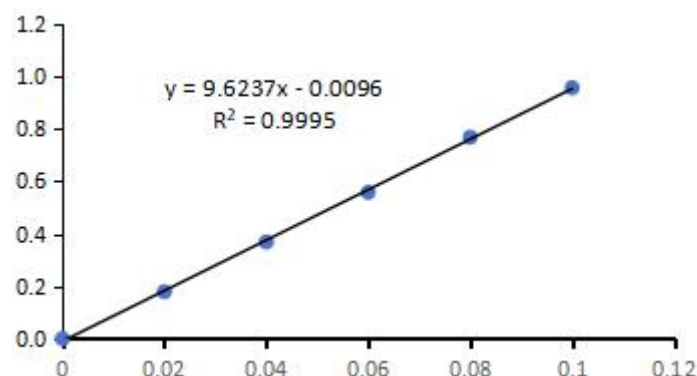
③ 显色反应：在 96 孔中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	对照管
试剂二	70	70
试剂三	10	10
试剂四	10	10
上清液	100	100
试剂五	10	10
混匀，30℃反应 30min，于 450nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。（若反应未终止即吸光值还在上升，须延长反应时间）		

【注】若 ΔA 差值在零附近徘徊，可在 37℃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 120μL，则试剂二相应减少），或增加样本提取阶段取样质量 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 $y = 9.6237x - 0.0096$ ，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。

$$\text{GlmS (nmol/h/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0096) \div 9.6237] \times V_2 \times 10^3 \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 519.6 \times (\Delta A + 0.0096) \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{GlmS (nmol/h/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0096) \div 9.6237] \times V_2 \times 10^3 \div (W \times V_1 \div V) \div T$$

$$= 519.6 \times (\Delta A + 0.0096) \div W$$

4、按细胞数量计算：

酶活定义：每 10⁴ 个细胞每小时生成 1 nmol 的谷氨酸 定义为一个酶活单位。

$$\text{GlmS (nmol/h/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0096) \div 9.6237] \times V_2 \times 10^3 \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 1.039 \times (\Delta A + 0.0096)$$

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 定义为一个酶活单位。

$$\text{GlmS (nmol/h/mL)} = [(\Delta A + 0.0096) \div 9.6237] \times V_2 \times 10^3 \div V_1 \div T = 519.6 \times (\Delta A + 0.0096)$$

V--提取液体积，1 mL； V1--加入样本体积，0.08 mL；

V2--反应总体积，0.2mL； 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：

- 标准品用 2mL 的蒸馏水溶解。（母液需在两天内用且 -20℃ 保存），标准品母液浓度为 10μmol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 μmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 标品稀释参照表如下：

1. 吸取标准品母液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 1μmol/mL 的标品稀释液；						
2. 吸取 1μmol/mL 的标品稀释液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 0.1μmol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μmol/mL	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
试剂二	70	70
试剂三	10	10
试剂四	10	10
标品	100	
蒸馏水		100
试剂五	10	10
混匀，30℃ 反应 30min，于 450nm 处读取吸光值 A（若反应未终止即吸光值还在上升，须延长反应时间）， ΔA=A 测定-0 浓度管。		