

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

微量法 100管/48样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义

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, 催化铵离子和谷氨酸合成谷氨酰胺, 不仅可以防止过多的铵离子对生物有毒性, 而且谷氨酰胺也是氨的主要储存和运输形式。

测定原理

GS在ATP和Mg²⁺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, 在酸性条件下与铁形成的络合物在540nm处有最大吸收峰, 可用分光光度计测定。

所需的仪器和用品

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

提取液: 100mL×1瓶, 4°C保存。

试剂一: 10mL×1瓶, -20°C保存; 临用前37°C预热20min, 充分混匀, 如有沉淀, 静置10min, 取上清待用。

试剂二: 10mL×1瓶, -20°C保存; 临用前37°C预热20min, 充分混匀, 如有沉淀, 静置10min, 取上清待用。

试剂三: 粉剂×2瓶, -20°C保存。用时每瓶加入5mL蒸馏水充分溶解待用。

试剂四: 15mL×1瓶, 4°C保存。

样本测定的准备

1、细菌、细胞或组织样品的制备:

细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10⁴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); 8000g 4°C离心10min, 取上清, 置冰上待测。

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

2、血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤

1. 分光光度计或酶标仪预热30min以上, 调节波长至540nm, 蒸馏水调零。
2. 在EP管中加入下列试剂:

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°C（哺乳动物）或25°C（其他物种）准确水浴30min

试剂四	100	100
-----	-----	-----

混匀，25°C室温静置10min后，8000g，25°C离心10min，取200μL上清液至微量石英比色皿或96孔板中，测定540nm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。

GS活力单位的计算

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准曲线： $y = 0.8348x + 0.0008$ ， $R^2 = 0.9999$

1、血清（浆）GS活性

单位定义：每mL血清（浆）在每mL反应体系中每小时产生1μmol γ-谷氨酰基异羟肟酸定义为一个酶活力单位。

计算公式：

$$\begin{aligned} \text{GS} (\mu\text{mol/h/mL}) &= (\Delta A - 0.0008) \div 0.8348 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 10.268 \times \Delta A \end{aligned}$$

2、组织、细菌或细胞GS活性

(1) 按样本蛋白浓度计算：

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

$$\begin{aligned} \text{GS} (\mu\text{mol/h/mg prot}) &= (\Delta A - 0.0008) \div 0.8348 \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 10.268 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按样本鲜重计算：

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

$$\begin{aligned} \text{GS} (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0008) \div 0.8348 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 10.268 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

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1μmol γ-谷氨酰基异羟肟酸定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GS} (\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A - 0.0008) \div 0.8348 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.021 \times \Delta A \end{aligned}$$

V反总：反应体系总体积，0.3mL； V样：加入样本体积，0.07mL； 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； 500：细菌或细胞总数，500万。

b.用96孔板测定的计算公式如下

标准曲线: $y = 0.4174x + 0.0008$, $R^2 = 0.9999$

1、血清（浆）GS活性

单位定义: 每mL血清（浆）在每mL反应体系中每小时产生 $1\mu\text{mol}$ γ -谷氨酰基异羟肟酸定义为一个酶活力单位。

计算公式:

$$\text{GS } (\mu\text{mol/h/mL}) = (\Delta A - 0.0008) \div 0.4174 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T$$

$$= 20.535 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞GS活性

(1) 按样本蛋白浓度计算:

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

$$\text{GS } (\mu\text{mol/h/mg prot}) = (\Delta A - 0.0008) \div 0.4174 \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T$$

$$= 20.535 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每g组织在每mL反应体系中每小时产生 $1\mu\text{mol}$ γ -谷氨酰基异羟肟酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{GS } (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = (\Delta A - 0.0008) \div 0.4174 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 20.535 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

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 $1\mu\text{mol}$ γ -谷氨酰基异羟肟酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{GS } (\mu\text{mol/h/104 cell}) = (\Delta A - 0.0008) \div 0.4174 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

$$= 0.041 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 0.3mL; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.07mL; $V_{\text{样总}}$: 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; 500: 细菌或细胞总数, 500万。