

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, 是生物体内氮同化的关键酶之一, 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, 而且谷氨酰胺也是氮的主要储存和运输形式。

测定原理

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℃ 保存。

试剂一: 10mL×1 瓶, -20℃ 保存; 临用前 37℃ 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℃ 保存; 临用前 37℃ 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℃ 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℃ 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 (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 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℃ 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℃ 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 (μ L)	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 30min		
试剂四	100	100

混匀，25℃室温静置 10min 后，8000g，25℃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, R² = 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：

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

$$= 10.268 \times \Delta A$$

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。

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

$$= 10.268 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

（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。

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

$$= 10.268 \times \Delta A \div W$$

（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。

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

$$= 0.021 \times \Delta A$$

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； C_{pr}：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, R² = 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：

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

$$=20.535 \times \Delta A$$

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 μ mol γ -谷氨酰基异羟肟酸定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GS } (\mu\text{mol/h/mg prot}) &= (\Delta A - 0.0008) \div 0.4174 \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 20.535 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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 1 μ mol γ -谷氨酰基异羟肟酸定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GS } (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= (\Delta A - 0.0008) \div 0.4174 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 20.535 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(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 1 μ mol γ -谷氨酰基异羟肟酸定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GS } (\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A - 0.0008) \div 0.4174 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.041 \times \Delta A \end{aligned}$$

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。