

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

微量法 100 管/48 样

**注 意：**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  $\gamma$ -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 (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。

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

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

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

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

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

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

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

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。