

## 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，而且谷氨酰胺也是氨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（ $\mu\text{L}$ ）	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 200 $\mu\text{L}$  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。  $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。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 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：

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

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

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

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

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

### (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 1 $\mu$ mol  $\gamma$ -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 $\mu$ mol  $\gamma$ -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。