

谷氨酰胺合成酶 (GS) 测定试剂盒

(货号: BC110 比色法)

一、测定意义

谷氨酰胺合成酶 (Glutamine synthetase, GS) 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的毒性, 而且谷氨酰胺也是氮的主要储存和运输形式。

二、测定原理

GS 在 ATP 和 Mg^{2+} 的存在下, 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, 在酸性条件下形成的络合物在 540nm 处有最大吸收峰, 可用分光光度计测定其吸光值来判定 GS 的活力。

三、所用仪器与耗材

可见光分光光度计、恒温水浴锅、离心机、1mL 玻璃或石英比色皿、研钵、蒸馏水等

四、试剂组成和配置 (24T)

提取液: 30mL×1 瓶, 4°C 保存。

试剂一: 12mL×1 瓶, -20°C 保存。使用时 37°C 预热 20min, 充分混匀, 如有沉淀, 静置 10min, 取上清待用。

试剂二: 12mL×1 瓶, -20°C 保存。使用时 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。使用时每瓶粉剂加入 5mL 蒸馏水充分溶解待用。

试剂四: 15mL×1 瓶, 4°C 保存。

五、样本前处理

- 组织:** 按照组织重量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1:10 的比例混合后, 冰水浴匀浆, 4000 转/min 离心 10min, 取上清置冰上待测。
- 血清 (浆):** 直接取样测定。
- 细胞、细菌或组织样品:** 收集细胞或细菌于离心管中, 离心后弃上清, 按照细胞或细菌数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500: 1 的比例混合, 超声波破碎细胞或细菌 (条件: 冰浴、功率 20% 或 200W、超声 3s、间隔 10s、重复 30 次) 后待测。

六、测定步骤

	测定管	对照管
待测样本 (μ L)	175	175
试剂一 (μ L)	400	
试剂二 (μ L)		400
试剂三 (μ L)	175	175
混匀, 37°C (动物) 或 25°C (其他物种) 反应 30min		
试剂四 (μ L)	250	250
混匀, 室温静置 10min, 4000 转/min 离心 10min, 取上清在 540nm 处, 1cm 光径比色皿, 蒸馏水调零, 测各管 OD 值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$		



注：在进行正式实验前最好取 1-2 个样本上清进行预试，以便确定样本最佳取样浓度。

七、计算方法

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

1、血清（浆）计算方法

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

计算公式：

$$\text{血清(浆)中GS活力} = \frac{\Delta A - 0.0008}{0.8348} \times V_{\text{反应总}} \div V_{\text{样}} \div T$$

($\mu\text{mol/h/mL}$)

2、组织、细菌、细胞计算方法

(1)、按样本蛋白浓度计算：

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

计算公式：

$$\text{组织、细胞、细菌中GS活力} = \frac{\Delta A - 0.0008}{0.8348} \times V_{\text{反应总}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T$$

($\mu\text{mol/h/mgprot}$)

(2)、按样本鲜重计算：

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

计算公式：

$$\text{组织、细胞、细菌中GS活力} = \frac{\Delta A - 0.0008}{0.8348} \times V_{\text{反应总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

($\mu\text{mol/h/g}$)

(3)、按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细胞或细菌在每 mL 反应体系中每小时产生 $1\mu\text{mol}$ 的 γ -谷氨酰基异羟肟酸为一个酶活力单位。

计算公式：

$$\text{细胞或细菌中GS活力} = \frac{\Delta A - 0.0008}{0.8348} \times V_{\text{反应总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$

($\mu\text{mol/h}/10^4\text{cell}$)

$V_{\text{反应总}}$:反应液总体积,0.75mL;

$V_{\text{样}}$:取样量 0.175mL;

T :反应时间,0.5h;

Cpr :样本蛋白浓度,mgprot/mL(prot 指蛋白);

W :样本质量,g;

$V_{\text{样总}}$: 提取液总体积;

500:细胞数,万个。

