

谷氨酰胺合成酶（GS）检测试剂盒（分光光度法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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，在酸性条件下形成的络合物在 540nm 处有最大吸收峰，可用分光光度计测定。

试剂组成和配制：

提取液：30mL×1 瓶，4℃ 保存。

试剂一：12mL×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。

试剂二：12mL×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	400	
试剂二		400
试剂三	175	175
样本	175	175
混匀, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其他物种) 准确水浴 30min		
试剂四	250	250

混匀, 25°C 室温静置 10min 后, 5000g, 25°C 离心 10min, 取上清液测定 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:

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。

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

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, 0.75mL;

V 样: 加入样本体积, 0.175mL;

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。