

## 谷氨酰胺合成酶（GS）测试盒

比色法: 50 管/24 样

### 一、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  $\gamma$ -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。

### 二、试剂组成和配置

提取液：30ml×1 瓶，4℃保存。

试剂一：12ml×1 瓶，-20℃保存。使用时 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。使用时 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。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℃保存。

### 三、样本前处理

1、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。

2、血清（浆）：直接取样测定。

3、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。

### 四、测定步骤

	测定管	对照管
待测样本 (μl)	175	175
试剂一 (μl)	400	
试剂三 (μl)		400
试剂三 (μl)	175	175
混匀, 37°C (动物) 或 25°C (其他物种) 反应 30min		
试剂四 (μl)	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, ΔA=A 测定 - A 对照		

## 五、酶活力计算:

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  $\gamma$ -谷氨酰基异羟肟酸为一个酶活力单位。

#### 计算公式:

$$\text{血清 (浆) 中 GS 活力} = \frac{\Delta A - 0.0008}{0.8348} \times \frac{\text{反应体系总体积}}{(0.75\text{ml})} \div \frac{\text{取样量}}{(0.175\text{ml})} \div \frac{\text{反应时间}}{(0.5\text{h})}$$

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

## 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  $\gamma$ -谷氨酰基异羟肟酸为一个酶活力单位。

计算公式:

$$\text{组织、细胞、细菌中 GS 活力} = \frac{\Delta A - 0.0008}{0.8348} \times \frac{\text{反应体系总体积}}{(0.75\text{mL})} \div \left( \frac{\text{样本蛋白浓度}}{\text{mg prot / mL}} \times \frac{\text{取样量}}{0.175\text{mL}} \right) \div \frac{\text{反应时间}}{(0.5\text{h})}$$

( $\mu\text{mol / h / mg prot}$ )

(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  $\gamma$ -谷氨酰基异羟肟酸为一个酶活力单位。

计算公式:

$$\text{组织、细胞、细菌中 GS 活力} = \frac{\Delta A - 0.0008}{0.8348} \times \frac{\text{反应液总体积}}{(0.75\text{mL})} \div \left( \frac{\text{样本重量}}{\text{g}} \times \frac{\text{取样量}}{0.175\text{mL}} \div \frac{\text{提取液体积}}{\text{mL}} \right) \div \frac{\text{反应时间}}{(0.5\text{h})}$$

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

(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  $\gamma$ -谷氨酰基异羟肟酸为一个酶活力单位。

计算公式:

$$\text{细胞或细菌中 GS 活力} = \frac{\Delta A - 0.0008}{0.8348} \times \frac{\text{反应液总体积}}{(0.75\text{mL})} \div \left( \frac{500}{\text{取样量}} \times \frac{\text{提取液体积}}{\text{mL}} \right) \div \frac{\text{反应时间}}{(0.5\text{h})}$$

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

