

GLUTAMINE SYNTHETASE [GS II]

from *Bacillus* sp.

(L-Glutamate: ammonia Ligase (ADP-forming), EC 6.3.1.2)



Preparation and Specification

Appearance : White to pale brownish lyophilized powder
 Specific activity : More than 15U/mg
 Contaminants : NADH oxidase Less than 0.05% (U/U)

Properties

Michaelis constant	: NH ₄ Cl	0.05 mM	
	Glutamic acid	10.9 mM	
Isoelectric point	: pH 4.85		
Molecular weight	: 500KDa (TSK G3000SW _{XL})		
	53KDa (SDS-PAGE)		
Optimum pH	: 8-9		Figure 1
pH stability	: 5.0-9.5 (37°C, 60min)		Figure 2
Optimum temperature	: 60°C (pH8.0, 50mM Tris-HCl buffer)		Figure 3
Thermal stability	: Stable at 60°C and below (pH8.0, 10min)		Figure 4
Storage stability	: -20°C		
Effect of metal ions	: See Table 1		

Applications for Diagnostic Test

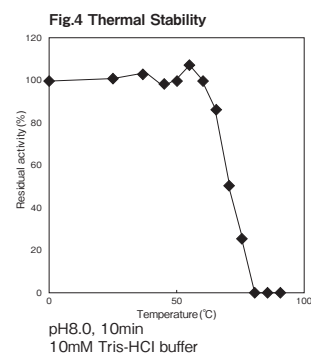
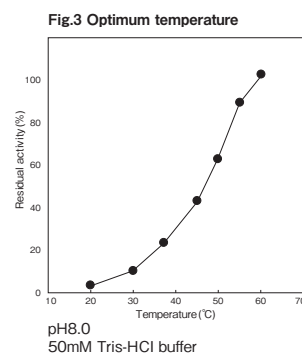
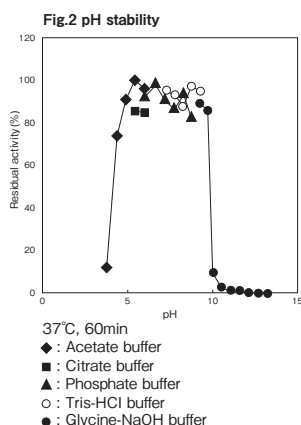
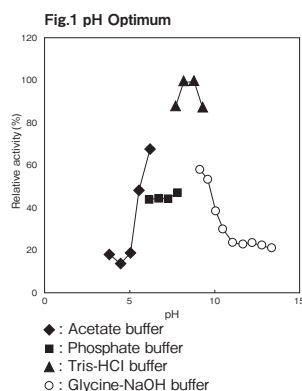
This enzyme is useful for **elimination of ammonia** in a diagnostic reagent.

GS II



Table 1. Effect of metal ions GS II activity

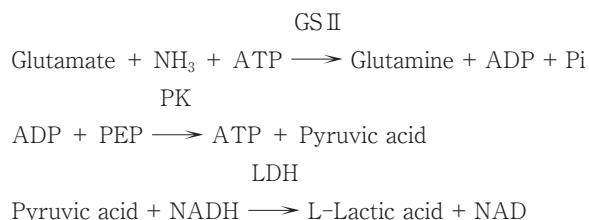
Metal	%	Metal	%
None	100	AgCl	82
NaCl	101	CsCl	90
KCl	97	NH ₄ Cl	69
EDTA	0	ZnSO ₄	0
LiCl	92	CuSO ₄	0

※ 10mM Metal ion with 5mM MgCl₂

Assay

■ Principle

The assay is based on the decrease in absorbance at 340 nm as the consumption of NADH proceeds in the following reactions:



PK : Pyruvate kinase
LDH : Lactate dehydrogenase
PEP : Phosphoenol pyruvate

■ Unit definition

One unit is defined as the amount of enzyme which produces 1 μ mole of glutamine per minute at 37 °C under the conditions specified in the assay procedure.

■ Reagents

- Reaction mixture

0.2 M Tris-HCl buffer pH 8.0	0.75 ml
60 mM ATP solution pH 8.0	0.30 ml
1 M NH ₄ Cl solution	0.30 ml
30 mM PEP solution	0.20 ml
7.86 mM NADH solution	0.10 ml
0.6 M MgCl ₂ solution	0.15 ml
100 U/ml PK ¹⁾ solution	0.10 ml
340 U/ml LDH ²⁾ solution	0.10 ml

- | | |
|-------------------------|---------|
| 0.45 M Glutamic acid Na | 0.60 ml |
| Distilled water | 0.40 ml |
- 1): 100U/ml PK

Stock solution (2000U/ml) of PK with distilled water to make 20-fold solution.

- 2): 340U/ml LDH

Stock solution (5500U/ml) of LDH with distilled water to make 16-fold solution.

- Enzyme dilution buffer
10mM Tris-HCl buffer pH8.0
- Reagent

Tris (hydroxymethyl) aminomethane:

Sigma Chemical Co. #T-1503

ATP (2Na·3H₂O·Reduced form): Kyowa Hakko Co., Ltd

NADH (2Na·3H₂O·Reduced form): Kyowa Hakko Co., Ltd

PEP [Phospho(enol)pyruvic acid
tri(cyclohexylammonium) salt] :

Sigma Chemical Co. #P-7252

NH₄Cl:FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

Special grade #015-02991

MgCl₂·6H₂O:

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

Special grade #131-00162

PK:Roche Diagnostics GmbH #10 128 163 001

LDH:Roche Diagnostics GmbH #10 127 876 001

Glutamic Acid Monosodium Salt:

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

Special grade #198-02035

■ Enzyme solution

Accurately weigh about 10 mg of the sample and add enzyme dilution buffer to make a total of 10 ml. Dilute it with enzyme dilution buffer to adjust the concentration as required.

■ Procedure

1. Pipette accurately 3.0 ml of reaction mixture into a small test tube and Preincubate at 37°C
2. After 5min. add accurately 60 μ l of enzyme solution and mix to start the reaction at 37°C
※ In the case of a test blank add 60 μ l of enzyme dilution buffer in place of enzyme solution
3. After starting the reaction, measure the rate of increase per minutes in absorbance at 340 nm. The rate must be measured within the linear portion of the absorbance curve. (Ex. Linear range from 3 min to 6 min)

Absorbance sample : As/min

blank : Ab/min

$$\Delta A/\text{min} = (A_s/\text{min} - A_b/\text{min}) \leq 0.15 \text{ Abs/min}$$

■ Calculation

$$\text{Activity (U/mg)} = \frac{\Delta A/\text{min}}{6.3} \times \frac{3.06}{0.06} \times \frac{1}{X}$$

6.3 : millimolar extinction coefficient of NADH at 340nm
($\text{cm}^2 / \mu\text{mol}$)

3.06 : final volume (ml)

0.06 : volume of enzyme solution (ml)

X : concentration of the sample in enzyme solution

GSII 活性測定法 (Japanese)

I. 試薬液

1. 0.2M Tris-HCl (pH8.0)
Tris 2.42g を精製水 80ml に溶解した後、1N HCl で pH8.0 (25°C) に調整し、精製水で全容 100ml とする。
2. 60mM ATP (pH8.0)
ATP-Na 1.816g を精製水 80ml に溶解した後、4N NaOH で pH8.0 (25°C) に調整し、精製水で全容 50ml とする。
3. 1M NH_4Cl
 NH_4Cl 5.349g を精製水で溶解し、全容 100ml とする。
4. 30mM PEP
PEP 0.698g を精製水で溶解し、全容 50ml とする。
5. 7.86mM NADH
NADH31mg を 5ml 精製水で溶解する。
6. 0.6M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 MgCl_2 12.198g を精製水で溶解し、全容 100ml とする。
7. 100U/ml PK
原液 (2000U/ml) を精製水にて 20 倍希釈して使用。
8. 340U/ml LDH
原液 (5500U/ml) を精製水にて 16 倍希釈して使用。
9. 0.45M グルタミン酸 Na
グルタミン酸 Na 8.421g を精製水で溶解し、全容 100ml とする。
10. 反応試薬混合液
0.2M トリス-HCl 緩衝液 pH8.0 0.75 ml
60mM ATP pH8.0 0.3 ml
1M NH_4Cl 0.3 ml

30mM PEP	0.2 ml
7.86mM NADH	0.1 ml
0.6M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.15 ml
100U/ml PK	0.1 ml
340U/ml LDH	0.1 ml
0.45M グルタミン酸 Na	0.6 ml
精製水	0.4 ml

11. 酵素溶解希釈用液 (10mM トリス-HCl 緩衝液 pH8.0)
Tris 1.211g を精製水 80ml に溶解した後、1N HCl で pH8.0 (25°C) に調整し、精製水で全容 1L とする。

12. 試薬リスト

トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン :

シグマ製 #T-1503

ATP (アデノシン三リン酸 $\cdot$ 2Na $\cdot$ 3H $_2$ O) : 協和発酵製 NH_4Cl :

富士フイルム和光純薬製 特級 #015-02991

PEP [ホスホ (エノール) ピルビン酸トリ (シクロヘキシルアンモニウム) 塩] : シグマ製 #P-7252

NADH (2Na $\cdot$ 3H $_2$ O $\cdot$ 還元型) : 協和発酵製

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$:

富士フイルム和光純薬製 特級 #131-00162

PK (Pyruvate kinase) : ロシュ製 #10 128 163 001

LDH (Lactate dehydrogenase) :

ロシュ製 #10 127 876 001

グルタミン酸 Na :

富士フイルム和光純薬製 特級 #198-02035

II. 酵素試料液

検品約 10mg を精密に量り、酵素溶解希釈用液に溶解して全容 10ml とする。

その液を酵素溶解希釈用液で適宜希釈する。

Ⅲ. 測定操作法

1. 小試験管に、反応試薬混合液 3.0ml を正確に分注し、37℃で予備加温する。
2. 5 分後、酵素試料液 0.06ml を正確に加えて混和し、37℃で反応を開始する。
3. 反応開始後、340nm における吸光度を測定して直線的に反応している 1 分間当たりの吸光度変化を求める。(直線範囲例:3 分から 6 分)
求められた吸光度変化を試料液については As/min、盲検液については Ab/min とする。
 $\Delta A/\text{min} = (A_s/\text{min} - A_b/\text{min}) = \leq 0.15\text{Abs}/\text{min}$

Ⅳ. 計算

以下の計算式に従い、活性 (U/mg) を計算する。

$$\text{活性 (U/mg)} = \frac{\Delta A/\text{min}}{6.3} \times \frac{3.06}{0.06} \times \frac{1}{X}$$

6.3 : NADH の 340nm におけるミリモル分子吸光係数
($\text{cm}^2 / \mu\text{mol}$)

3.06 : 総反応液量 (ml)

0.06 : 反応に供した酵素試料液量 (ml)

X : 試料液中の酵素検品濃度 (mg/ml)