

## 谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS) 活性测定试剂盒说明书

分光光度法 50 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：

GLS (EC 3.5.1.1) 是酰胺基水解酶，催化天冬酰胺水解成谷氨酸和氨，在氮素代谢中具有重要调控作用，尤其是调节游离氨含量和尿素代谢。

### 测定原理：

GLS 催化谷氨酰胺水解成 L-谷氨酸和氨，利用奈氏试剂检测氨增加的速率，即可计算其酶活性。

### 需自备仪器和用品：

台式离心机、可见分光光度计、水浴锅、1mL 玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

### 试剂组成和配制：

试剂一×1 瓶，60 mL，4 °C 保存；

试剂二×1 瓶，20 mL，4 °C 保存；

试剂三×1 瓶，30 mL，常温保存；

试剂四×1 瓶，10 mL，常温保存；

试剂五×1 瓶，6 mL，常温保存；

试剂六×1 瓶，6 mL，常温避光保存。

### 粗酶液提取：

#### 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)：试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一)，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°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

组织：按照组织质量（g）：试剂一体积(mL)为 1： 5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一），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 420nm，蒸馏水调零。

2、样品测定（在 EP 中加入下列试剂）：

| 试剂名称（uL） | 测定管 | 对照管 |
|----------|-----|-----|
| 样本       | 25  |     |
| 蒸馏水      |     | 25  |
| 试剂一      | 100 | 100 |
| 试剂二      | 400 | 400 |

混匀，37℃水浴 1 小时

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 试剂三 | 525 | 525 |
|-----|-----|-----|

混匀，8000 g，25℃离心 10 min；取上清液，在 EP 管中加入下列试剂

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 上清液 | 650 | 650 |
| 试剂四 | 150 | 150 |
| 试剂五 | 100 | 100 |
| 试剂六 | 100 | 100 |

混匀，室温静置 15min，420nm 处读取吸光值 A，计算  $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。对照管只要做一管。

#### 注意：

1、试剂六如出现沉淀，静置后取上清使用。

2、 $\Delta A$ （ $A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ）若出现负值，可能是酶活性较低，可将反应时间 1h 延长到 2h，相应的在计算公式中除以 2。

#### 酶活性计算：

标准条件下测定的回归方程为  $y = 3.8488x + 0.0057$ ,  $R^2 = 0.9983$ ;  $x$  为标准品浓度 ( $\mu\text{mol/mL}$ ),  $y$  为吸光值  $A$ 。

## 1、血清（浆）GLS 活性

单位定义：每 mL 血清（浆）每 min 催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。GLS ( $\text{nmol/min/mL}$ ) =  $(\Delta A - 0.0057) \div 3.8488 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \times 1000 = 181.8 \times (\Delta A - 0.0057)$

## 2、组织、细菌或细胞 GLS 活性

### （1）按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每 mg 蛋白质每 min 催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

GLS ( $\text{nmol/min/mg prot}$ ) =  $(\Delta A - 0.0057) \div 3.8488 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times 1000 = 181.8 \times (\Delta A - 0.0057) \div \text{Cpr}$

### （2）按样本鲜重计算：

单位定义：每 g 组织每 min 催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

GLS ( $\text{nmol/min/g 鲜重}$ ) =  $(\Delta A - 0.0057) \div 3.8488 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000$

$$= 181.8 \times (\Delta A - 0.0057) \div W$$

### （3）按细菌或细胞密度计算

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每 min 催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。GLS

( $\text{nmol/min/104 cell}$ ) =  $(\Delta A - 0.0057) \div 3.8488 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000$

$$= 0.3637 \times (\Delta A - 0.0057)$$

$V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； $T$ ：反应时间，60min； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，1.05mL； $V_{\text{样}}$ ：加入反应体系中样本体积，0.025mL； $\text{Cpr}$ ：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；1000， $\mu\text{mol}$  到  $\text{nmol}$  换算系数。