

谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS) 活性测定试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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、酶标仪、96 孔板、可调式移液枪、研钵、冰和双蒸水。

试剂组成和配制：

- 试剂一×2 瓶，60 mL，4 °C 保存；
- 试剂二×1 瓶，40 mL，4 °C 保存；
- 试剂三×1 瓶，60 mL，常温保存；
- 试剂四×1 瓶，5 mL，常温保存；
- 试剂五×1 瓶，3 mL，常温保存；
- 试剂六×1 瓶，3 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°C 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、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 420nm。
- 2、样品测定（在 EP 管中加入下列试剂）：

试剂名称 (μL)	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°C 水浴 1 小时

试剂三	525	525
混匀，8000 g，25℃离心 10 min；取上清液，在 96 孔板中加入下列试剂		
上清液	130	130
试剂四	30	30
试剂五	20	20
试剂六	20	20

混匀，室温静置 15min，420nm 处读取测定管和对照管吸光值，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、 ΔA ($A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$) 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 $y = 1.9244x + 0.0057$ ， $R^2 = 0.9983$ ； 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(nmol/min/mL) = $(\Delta A - 0.0057) \div 1.9244 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \times 1000 = 363.7 \times (\Delta A - 0.0057)$

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(nmol/min/mg prot) = $(\Delta A - 0.0057) \div 1.9244 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 = 363.7 \times (\Delta A - 0.0057) \div C_{\text{pr}}$

(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(nmol/min/g 鲜重) = $(\Delta A - 0.0057) \div 1.9244 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 = 363.7 \times (\Delta A - 0.0057) \div W$

(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(nmol/min/ 10^4 cell) = $(\Delta A - 0.0057) \div 1.9244 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 = 0.7274 \times (\Delta A - 0.0057)$

$V_{\text{样总}}$ ：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； C_{pr} ：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， μmol 到 nmol 换算系数。