

谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS) 活性测定试剂盒说明书

微量法 100管/96样

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。

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（ μ L）	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°C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。

谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS) 活性测定试剂盒说明书注意：

1、试剂六如出现沉淀，静置后取上清使用。

2、 ΔA （A测定管-A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。 $\text{GLS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta A - 0.0057) \div 1.9244 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \times 1000 = 363.7 \times (\Delta A - 0.0057)$

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。

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

(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。

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

(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。 $\text{GLS}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A - 0.0057) \div 1.9244 \times V_{\text{反总}}$

$$\text{总} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000 = 0.7274 \times (\Delta A - 0.0057)$$

V_{样总}: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 60min; V_{反总}: 反应体系总体积, 1.05mL; V_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。

www.pyram.cn