

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

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。

组成：

产品名称	NM005-50T/48S	Storage
试剂一：液体	60 ml	4°C
试剂二：液体	20 ml	4°C
试剂三：液体	30 ml	常温
试剂四：液体	10 ml	常温
试剂五：液体	6 ml	常温
试剂六：液体	6 ml	常温避光
说明书	一份	

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。

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。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司，保留一切权利



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 (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°C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、 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 $y = 3.8488x + 0.0057$, $R^2 = 0.9983$; ; 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 (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 (nmol/min/mg prot) = $(\Delta A - 0.0057) \div 3.8488 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \times 1000 = 181.8 \times (\Delta A - 0.0057) \div C_{\text{pr}}$

(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) = $(\Delta A - 0.0057) \div 3.8488 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000$
 $= 181.8 \times (\Delta A - 0.0057) \div W$

(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

($\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}$) = $(\Delta A - 0.0057) \div 3.8488 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000$



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

V 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；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， μmol 到 nmol 换算系数。

