

## 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。

### 组成：

| 产品名称   | NM006-100T/96S | Storage |
|--------|----------------|---------|
| 试剂一：液体 | 60 ml          | 4°C     |
| 试剂二：液体 | 40 ml          | 4°C     |
| 试剂三：液体 | 60 ml          | 常温      |
| 试剂四：液体 | 5 ml           | 常温      |
| 试剂五：液体 | 3 ml           | 常温      |
| 试剂六：液体 | 3 ml           | 常温避光    |
| 说明书    | 一份             |         |

### 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。

### 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、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°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。

**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  $y = 1.9244x + 0.0057$ ， $R^2 = 0.9983$ ；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。

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



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; 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。

