

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。

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°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、 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。

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

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， μmol 到 nmol 换算系数。