

谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS) 活性测定试剂盒说明书

(货号: G0407W 微板法 96 样)

一、产品简介:

谷氨酰胺酶 (GLS, EC 3.5.1.2) 是酰胺酶的一种, 催化谷氨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。

谷氨酰胺酶 (GLS) 催化谷氨酰胺水解成 L-谷氨酸和氨, 利用氨在强碱的环境下与次氯酸盐和苯酚作用, 生成水溶性染料靛酚蓝, 溶液颜色稳定。其在 630nm 处有特征吸收峰, 通过检测氨增加的速率, 即可计算该酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 mg×2 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 每瓶再加 11mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	液体 12mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	液体 6mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂六	A: 液体 3.5mL×4 瓶 B: 液体 μ L×1 支	4℃ 保存	临用前取 30 μ L 的 B 液进一瓶 A 液中, 混匀后作为试剂六使用。混匀后的试剂六一周内用完。
标准管	液体 mL×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该标曲。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液枪、研钵、冰和蒸馏水。

四、谷氨酰胺酶 (GLS) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本: 称取约 0.1g 组织 (水分足的样本可取 0.2-0.5g), 加入 1mL 提取液; 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 也可以按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例提取。

② 细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 630nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃), 在 EP 管依次加入:

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
样本	40	40
试剂一	100	100
试剂二	100	
试剂三		100
混匀, 放入 37℃ 水浴锅或恒温培养箱中孵育 1h		

试剂二		100
试剂三	100	
混匀，室温 12000rpm 离心 10min，上清液待测。		

③ 显色反应：在 96 孔板中依次加入：

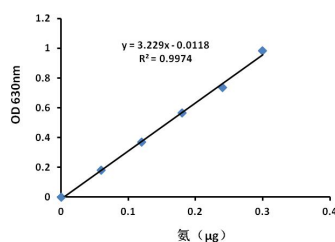
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
上清液 (上步反应)	30	30
蒸馏水	30	30
试剂四	60	60
试剂五	30	30
试剂六	60	60
充分混匀，37℃放置 20min 后，于 630nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

【注】1. 试剂四和五和六需分开加，不能事先混匀。

2. 若 ΔA 的值较小，可增加 37℃ 孵育时间 (如增至 2 小时或更长)，或在显色阶段增加上清液量 V1 (如增至 60μL，则蒸馏水体积相应减少)；则改变后的 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

3. 若 A 测定大于 1.5，可减少 37℃ 孵育时间 (如减至 0.5 小时或更短)，或在显色阶段减少上清液量 V1 (如减至 15μL，则蒸馏水体积相应增加)；则改变后的 T 和 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1. 标准曲线方程为 $y = 3.229x - 0.0118$ ；x 为标准品质量 (μg)，y 为吸光值 ΔA 。

2. 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克蛋白质每小时催化谷氨酰胺生成 1μg 氨定义为一个酶活力单位。

$$GLS(\mu g/h/mg \text{ prot}) = (\Delta A + 0.0118) \div 3.229 \times (V2 \div V3) \div (V1 \times Cpr) \div T = 87.75 \times (\Delta A + 0.0118) \div Cpr$$

3. 按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每小时催化谷氨酰胺生成 1μg 氨定义为一个酶活力单位。

$$GLS(\mu g/h/g \text{ 鲜重}) = (\Delta A + 0.0118) \div 3.229 \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T = 87.75 \times (\Delta A + 0.0118) \div W$$

4. 按细胞数量计算：

单位定义：每 10^4 个细胞每小时催化谷氨酰胺生成 1μg 氨定义为一个酶活力单位。

$$GLS(\mu g/h/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A + 0.0118) \div 3.229 \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.18 \times (\Delta A + 0.0118)$$

5. 按照液体体积计算：

单位定义：每毫升液体每小时催化谷氨酰胺生成 1μg 氨定义为一个酶活力单位。

$$GLS(\mu g/h/mL) = (\Delta A + 0.0118) \div 3.229 \times (V2 \div V3) \div V1 \div T = 87.75 \times (\Delta A + 0.0118)$$

V---提取液体积，1mL；

V1---加入②步反应体系中样本体积，0.04mL；

V2---②步反应体系总体积：0.34mL；

V3---③步显色步骤中上清液体积，0.03mL；

T---反应时间，1h；

W---样本质量；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

1 标准品母液 (10μg/mL 氨)，把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 2, 4, 6, 8, 10 μg/mL。

2 按照显色反应阶段的测定管加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。