

谷氨酰胺酶 (Glutaminase, GLS) 活性试剂盒说明书(精简版)

(货号: A124-1-1 分光光度法 50T/48 样)

一、测定意义:

GLS (EC 3.5.1.2) 存在于高等动物和某些细菌以及植物根中, 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。

二、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。

三、所需的仪器和用品:

台式离心机、可见分光光度计、水浴锅、1mL 玻璃比色皿、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配制:

试剂一: 60mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 粉剂×2 瓶, 4℃ 避光保存; **临用前每瓶加 12.5mL 蒸馏水溶解完全待用, 现用现配;**

试剂三: 30mL×1 瓶, 常温保存。

试剂四: 10mL×1 瓶, 常温保存。

试剂五: 6mL×1 瓶, 常温保存。

试剂六: 6mL×1 瓶, 常温避光保存。

五、样本前处理:

1、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, 然后 8000g, 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测;

2、细菌、真菌、细胞: 按照细胞数量 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500-1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 200w, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 然后 8000g, 4℃, 离心 10min, 取上清置于冰上待测;

3、血清/浆: 直接测定

六、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 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℃ 水浴 1 小时		
试剂三	525	525
混匀, 8000g、常温离心 10 min; 取上清液待测		
上清液	650	650
试剂四	150	150
试剂五	100	100
试剂六	100	100
混匀, 静置 15 分钟, 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、试剂六如果出现沉淀, 静止后取上清液测定; ②、 ΔA 若出现负值, 可能是酶活力值太低了, 可将反应时间延长到 2 小时, 计算时除以 2。

七、GLS 活力的计算:

标准曲线回归方程 $y = 3.8488x + 0.0057$, $R^2 = 0.9983x$ 为标准浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), y 为吸光度值 A

(1)、按蛋白浓度计算

单位定义: 每 mg 蛋白每分钟催化谷氨酰胺生成 1nmol

氨定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GLS 活力} &= \frac{(\Delta A - 0.0057) \times V_{\text{反应}} \times 1000}{3.8488 \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} \\ &= \frac{181.8 \times (\Delta A - 0.0057)}{\text{Cpr}} \end{aligned}$$

(2)、按样本质量计算

单位定义: 每 g 组织每分钟催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GLS 活力} &= \frac{(\Delta A - 0.0057) \times V_{\text{反应}} \times V_{\text{样总}} \times 1000}{3.8488 \times V_{\text{样}} \times W \times T} \\ &= \frac{181.8 \times (\Delta A - 0.0057)}{W} \end{aligned}$$

(3)、按照细菌或细胞密度计算

单位定义: 每 1 万个细菌或者细胞每分钟催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GLS 活力} &= \frac{(\Delta A - 0.0057) \times V_{\text{反应}} \times V_{\text{样总}} \times 1000}{3.8488 \times V_{\text{样}} \times 500 \times T} \\ &= 0.3637 \times (\Delta A - 0.0057) \end{aligned}$$

(4)、血清(浆)计算

单位定义: 每 mL 血清(浆)每分钟催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GLS 活力} &= \frac{(\Delta A - 0.0057) \times V_{\text{反应}} \times 1000}{3.8488 \times V_{\text{样}} \times T} \\ &= 181.8 \times (\Delta A - 0.0057) \end{aligned}$$

Cpr: 上清液蛋白质含量 mg/mL;

V_样: 样本上样体积, 0.025mL;

V_{样总}: 加入提取液体积, 1mL;

V_{反应}: 反应总体积, 1.05mL;

W_{样品}: 样品质量, g;

T: 反应时间, 60min;

500: 细菌或者细胞总数, 500 万;

1000: μmol 到 nmol 换算系数。