

谷氨酰胺酶(GLS)活性检测试剂盒说明书

Glutaminase Assay Kit

微量法

货号: AK083

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
提取液 ES52	60mL×2 瓶	4℃保存;
AK083-B	粉剂×2 瓶	4℃避光保存; 临用前每瓶加入 25mL 蒸馏水充分溶解待用, 现配现用;
AK083-C	60mL×1 瓶	常温保存;
AK083-D	5mL×1 瓶	常温保存;
AK083-E	3 mL×1 瓶	常温保存;
AK083-F	3 mL×1 瓶	常温避光保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 谷氨酰胺酶 (glutaminase, 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。

原理: 谷氨酰胺酶 (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。

自备用品:

分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、水浴锅、可调式移液枪、研钵、冰和双蒸水。

粗酶液提取:

1. 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): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液 ES52), 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℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 组织: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液 ES52, 进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
3. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 420nm, 蒸馏水调零。
2. 样本测定, 在 EP 管中加入下列试剂:

试剂名称	测定管 (ul)	对照管 (ul)
样本	25	
蒸馏水		25
提取液 ES52	100	100
AK083-B	400	400
混匀, 37℃水浴 1 小时		
AK083-C	525	525
混匀, 8000 g, 25℃离心 10 min; 取上清液, 在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂:		

上清液	130	130
AK083-D	30	30
AK083-E	20	20
AK083-F	20	20
混匀，混匀，室温静置 15min，420nm 处读取测定管和对照管吸光值，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		
注：对照管只要做 1-2 次。		

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）每小时催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

计算公式： $\text{GLS (U/mL)} = (\Delta A - 0.0057) \div 1.9244 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \times 1000 = 363.7 \times (\Delta A - 0.0057)$

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 蛋白质每小时催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

计算公式： $\text{GLS (U/mg prot)} = (\Delta A - 0.0057) \div 1.9244 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \times 1000$
 $= 363.7 \times (\Delta A - 0.0057) \div \text{Cpr}$

（2）按样本鲜重计算：

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

计算公式： $\text{GLS (U/g 鲜重)} = (\Delta A - 0.0057) \div 1.9244 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \times 1000$
 $= 363.7 \times (\Delta A - 0.0057) \div W$

（3）按细菌或细胞密度计算

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每小时催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

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

注： $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； T ：反应时间，60min； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，1.05mL；

$V_{\text{样}}$ ：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。