

谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS) 活性测定试剂盒说明书

(货号: G0407F 分光法 48 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 60mL×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 24mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	液体 12mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂六	A: 液体 7mL×4 瓶 B: 液体 μL×1 支	4℃ 保存	临用前取 60μL 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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液枪、研钵。

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 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 630nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃), 在 EP 管依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	80	80
试剂一	200	200
试剂二	200	
试剂三		200
混匀, 放入 37℃ 水浴锅或恒温培养箱中孵育 1h		

试剂二		200
试剂三	200	
混匀, 室温 12000rpm 离心 10min, 上清液待测。		

③ 显色反应: 在 EP 管中依次加入:

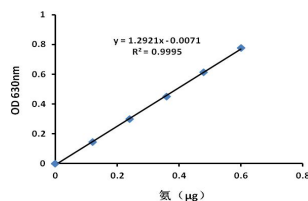
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
上清液 (上步反应)	60	60
蒸馏水	180	180
试剂四	240	240
试剂五	120	120
试剂六	240	240
充分混匀, 37°C 放置 20min 后, 全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 630nm 处读取吸光值 A, ΔA=A 测定管-A 对照管 (每个样本做一个自身对照)。		

【注】1. 试剂四和五和六需分开加, 不能事先混匀。

- 若 ΔA 的值较小, 可增加 37°C 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 120 μL, 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。
- 若 A 测定大于 1.8, 可减少 37°C 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 30 μL, 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 $y = 1.2921x - 0.0071$; 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 1 μg 氨定义为一个酶活力单位。

$$GLS(\mu\text{g/h/mg prot}) = (\Delta A + 0.0071) \div 1.2921 \times (V2 \div V3) \div (V1 \times Cpr) \div T = 110 \times (\Delta A + 0.0071) \div Cpr$$

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 1 μg 氨定义为一个酶活力单位。

$$GLS(\mu\text{g/h/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0071) \div 1.2921 \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T = 110 \times (\Delta A + 0.0071) \div W$$

4. 按细胞数量计算:

单位定义: 每 10⁴ 个细胞每小时催化谷氨酰胺生成 1 μg 氨定义为一个酶活力单位。

$$GLS(\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) = (\Delta A + 0.0071) \div 1.2921 \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.22 \times (\Delta A + 0.0071)$$

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 1 μg 氨定义为一个酶活力单位。

$$GLS(\mu\text{g/h/mL}) = (\Delta A + 0.0071) \div 1.2921 \times (V2 \div V3) \div V1 \div T = 110 \times (\Delta A + 0.0071)$$

V---提取液体积, 1mL;

V1----加入②步反应体系中样本体积, 0.08mL;

V2---②步反应体系总体积: 0.68mL;

V3---③步显色步骤中上清液体积, 0.06mL;

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:

- 标准品母液 (10 μg/mL 的氨), 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。
- 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。