

## 谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS) 活性测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-N003 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

### 一、指标介绍:

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:

| 试剂组分 | 试剂规格                         | 存放温度   | 注意事项                                                                           |
|------|------------------------------|--------|--------------------------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 100mL×1 瓶                 | 4℃保存   |                                                                                |
| 试剂一  | 液体 22mL×1 瓶                  | 4℃保存   |                                                                                |
| 试剂二  | 粉剂 2 瓶                       | 4℃保存   | 每瓶:<br>1. 开盖前注意使粉剂落入底部 (可手动甩一甩);<br>2. 每瓶再加 11mL 蒸馏水溶解备用;<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂三  | 液体 22mL×1 瓶                  | 4℃保存   |                                                                                |
| 试剂四  | 液体 14mL×1 瓶                  | 4℃避光保存 |                                                                                |
| 试剂五  | 液体 6mL×1 瓶                   | 4℃保存   |                                                                                |
| 试剂六  | A: 液体 3.5mL×4 瓶<br>B: 液体 1 支 | 4℃避光保存 | 1. 临用前取 30 μL 的 B 液进一瓶 A 液中, 混匀后作为试剂六使用;<br>2. 混匀后的试剂六避光保存, 一周内用完。             |
| 标准管  | 液体 1 支                       | 4℃保存   | 1. 若重新做标曲, 则用到该试剂;<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制;<br>3. 溶解后的标品一周内用完。                  |

### 三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

#### 1、样本提取:

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、检测步骤：

- 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：

| 试剂组分（μL）                       | 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：

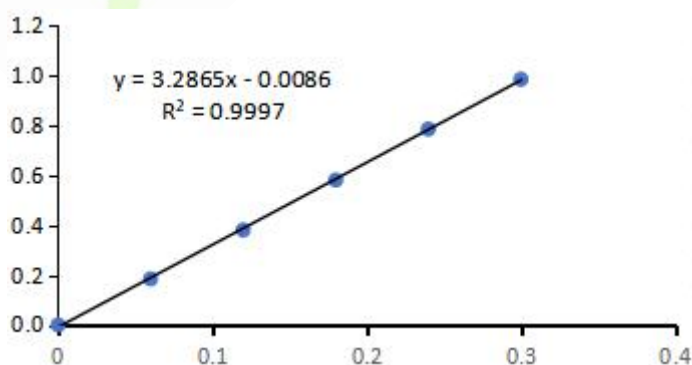
| 试剂组分（μL）                                                                                            | 测定管 | 对照管 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 上清液（上步反应）                                                                                           | 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，<br>$\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ （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  $\Delta A$  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  $y = 3.2868x - 0.0086$ ；x 为标准品质量（μg），y 为吸光值  $\Delta A$ 。



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。

$$GLS(\mu\text{g/h/mg prot}) = (\Delta A + 0.0086) \div 3.2868 \times (V_2 \div V_3) \div (V_1 \times C_{pr}) \div T = 86.2 \times (\Delta A + 0.0086) \div C_{pr}$$

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。

$$GLS(\mu\text{g/h/g 鲜重}) = (\Delta A + 0.0086) \div 3.2868 \times (V_2 \div V_3) \div (W \times V_1 \div V) \div T = 86.2 \times (\Delta A + 0.0086) \div W$$

#### 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  $1\mu\text{g}$  氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{GLS}(\mu\text{g/h}/10^4\text{ cell})=(\Delta A+0.0086)\div 3.2868\times(V2\div V3)\div(500\times V1\div V)\div T=0.172\times(\Delta A+0.0086)$$

#### 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  $1\mu\text{g}$  氨定义为一个酶活力单位。

$$\text{GLS}(\mu\text{g/h/mL})=(\Delta A+0.0086)\div 3.2868\times(V2\div V3)\div V1\div T=86.2\times(\Delta A+0.0086)$$

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 标准品母液浓度为  $10\mu\text{g/mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{g/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

| 标品浓度<br>$\mu\text{g/mL}$ | 0   | 2   | 4   | 6   | 8   | 10  |
|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标品稀释液<br>uL              | 0   | 40  | 80  | 120 | 160 | 200 |
| 水 uL                     | 200 | 160 | 120 | 80  | 40  | 0   |

各标准管混匀待用。

- 3 依据显色反应阶段的测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

| 试剂名称 ( $\mu\text{L}$ )                                                                             | 标准管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------|
| 标品                                                                                                 | 30  |              |
| 蒸馏水                                                                                                | 30  | 60           |
| 试剂四                                                                                                | 60  | 60           |
| 试剂五                                                                                                | 30  | 30           |
| 试剂六                                                                                                | 60  | 60           |
| 充分混匀， $37^\circ\text{C}$ 放置 20min 后，于 630nm 处读取吸光值 A，<br>$\Delta A=A_{\text{测定}}-0_{\text{浓度管}}$ 。 |     |              |