

谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS) 活性测定试剂盒说明书  
(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  | 液体 24mL×1 瓶 | 4℃ 保存 |                                  |
| 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、冰和蒸馏水。

四、谷氨酰胺酶（GLS）活性测定：

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<sup>4</sup>）：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℃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，<br>$\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ （每个样本做一个自身对照）。 |     |     |

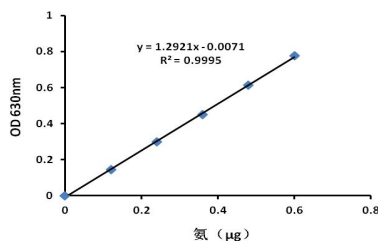
【注】1. 试剂四和五和六需分开加，不能事先混匀。

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 120μL，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 1.8，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 30μL，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  $\Delta A$ 。



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。

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

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 1μg 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  $10^4$  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。

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

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。

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

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：

- 1 标准品母液 (10μg/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。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 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。