

# 谷氨酰胺酶（GLS）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10314

规格：100T/48S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 70 mL×1 瓶	4℃保存
试剂一	粉剂×1 瓶	4℃保存
试剂二 A	液体 0.4 mL×1 支	4℃保存
试剂二 B	液体 1.6 mL×1 瓶	4℃保存
试剂三	液体 2 mL×1 瓶	常温保存
标准品	液体 1 mL×1 支	4℃保存

溶液的配制：

- 1、提取液：使用前 37℃预热；
- 2、试剂一：临用前加入 5 mL 提取液充分溶解待用；
- 3、试剂二 B：临用前将试剂二 A 倒入试剂二 B 中混匀（A:B=1：4 比例），或者根据样本所需，按照体积比试剂二 A：试剂二 B=1:4 现配现用；
- 4、标准品：10 μmol/mL 氮标准液，使用前 37℃预热。

**产品说明：**

GLS（EC3.5.1.2）主要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。

本试剂盒利用靛酚蓝比色法测定 GLS 催化谷氨酰胺生成的氨来计算其酶活性。

**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

**需自备的仪器和用品：**

台式离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和双蒸水。

**操作步骤：****一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

1. 组织：按照质量（g）：蒸馏水体积（mL）为 1：5-10 的比例（建议称取约 0.1g，加入 1mL 提取液），冰上匀浆后于 4℃，12000g 离心 15 min，取上清置于冰上待测。
2. 细胞：按照细胞数量（10<sup>4</sup>个）：提取液体积（mL）为 500-1000：1 的比例（建议 500 万个细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3s，间隔 7s，总时间 3min）；然后 4℃，12000g 离心 15min，取上清置于冰上待测。

**二、测定步骤**

1. 可见分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至630nm，蒸馏水调零。
2. 标准液的制备：将标准溶液用提取液稀释8倍得1.25 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 的标准溶液。
3. 样本测定：

试剂名称 ( $\mu\text{L}$ )	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	16	16	-	-
提取液	-	64	-	80
试剂一	64	-	-	-
混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴1小时				
标准液	-	-	80	-
试剂二	16	16	16	16
试剂三	12	12	12	12
蒸馏水	92	92	92	92

混匀，室温放置 30min，630nm 处读取吸光值 A，分别记为 A 测定管、A 对照管、A 标准管、A 空白管，计算  $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。

### 三、GLS 酶活性计算

#### 1、按样本蛋白浓度计算

单位定义：37 $^{\circ}\text{C}$ 下每 mg 蛋白质每小时催化谷氨酰胺生成 1 $\mu\text{mol}$   $\text{NH}_3\text{-N}$  定义为一个酶活力单位。

$$\text{GLS (U/mg prot)} = \Delta A \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标准}}) \times V_{\text{酶促}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 6.25 \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

#### 2、按样本质量计算

单位定义：37 $^{\circ}\text{C}$ 下每 g 组织每小时催化谷氨酰胺生成 1 $\mu\text{mol}$   $\text{NH}_3\text{-N}$  定义为一个酶活力单位。

$$\text{GLS (U/g 质量)} = \Delta A \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标准}}) \times V_{\text{酶促}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 6.25 \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$$

#### 3、按细胞数量计算

单位定义：37 $^{\circ}\text{C}$ 下每 500 万个细胞每小时催化谷氨酰胺生成 1 $\mu\text{mol}$   $\text{NH}_3\text{-N}$  定义为一个酶活力单位。

$$\text{GLS (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div (\Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{标准}}) \times V_{\text{酶促}} \div (V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \div T = 6.25 \times \Delta A \div \Delta A_{\text{标准}}$$

C 标准：标准液浓度，1.25 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ；V 酶促：酶促反应体积，0.08mL；V 提取：加入提取液体积，1mL；V 样本：上清液体积，0.016mL；T：反应时间，1h；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g。

### 注意事项：

- 1、当测定吸光值大于 0.8 时，建议将上清液用提取液进一步稀释后测量，计算时乘以稀释倍数。
- 2、试剂二配置后尽快使用，若发现变色则不能再用。

### 相关发表文献：

[1] Fu Y, Lei F, Wang J, et al. Maternal Cigarette Smoke Exposure Disturbs Glutamate/GABA Balance in pFRG of Neonatal Rats[J]. Respiratory Physiology & Neurobiology, 2020: 103383.

[2] Liu S, Li N, Lin Q, et al. Glutaminase 1 in mandarin fish Siniperca chuatsi: Molecular characterization, expression pattern and function involving in virus replication[J]. Aquaculture, 2020: 734924.

**参考文献:**

[1] Mahajan R V, Saran S, Kameswaran K, et al. Efficient production of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase activity: optimization, scale up and acrylamide degradation studies[J]. *Bioresource technology*, 2012, 125: 11-16.