

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

谷氨酰胺酶 (GLS) 检测试剂盒说明书

微量法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

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。

需自备仪器和用品：

台式离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔板、可调式移液枪、研钵、冰和双蒸水。

试剂组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	60 mL×2 瓶	4 °C保存	-
试剂二	40 mL×1 瓶	4 °C保存	-
试剂三	60 mL×1 瓶	常温保存	-
试剂四	5 mL×1 瓶	常温保存	-
试剂五	3 mL×1 瓶	常温保存	-
试剂六	3 mL×1 瓶	常温避光保存	-

粗酶液提取：

1、细菌、细胞或组织样品的制备：

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)：试剂一体积 (mL) 为500~1000: 1的比例 (建议500万细菌或细胞加入1mL试剂一)，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°C离心10min，取上清，置冰上待测。

组织：按照组织质量 (g)：试剂一体积 (mL) 为1: 5~10的比例 (建议称取约0.1g组织，加入1mL试剂一)，进行冰浴匀浆。8000g 4°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、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、样品测定 (在EP管中加入下列试剂):

试剂名称 (uL)	测定管	对照管
样本	25	
蒸馏水		25
试剂一	100	100
试剂二	400	400
混匀, 37°C水浴 1 小时		
试剂三	525	525
混匀, 8000 g, 25°C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
试剂四	30	30
试剂五	20	20
试剂六	20	20

混匀, 420nm 处读取测定管和对照管吸光值, 计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。对照管只要做一管。

酶活性计算:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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1 μmol 氮定义为一个酶活力单位。

$$\text{GLS } (\mu\text{mol/h/mL}) = 363.1 \times (\Delta A - 0.1301) \div T = 363.1 \times (\Delta A - 0.1301)$$

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1 μmol 氮定义为一个酶活力单位。

$$\text{GLS } (\mu\text{mol/h/mg prot}) = 363.1 \times (\Delta A - 0.1301) \div \text{Cpr} \div T = 363.1 \times (\Delta A - 0.1301) \div \text{Cpr}$$

(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1 μmol 氮定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GLS } (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= 363.1 \times (\Delta A - 0.1301) \div (W \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 363.1 \times (\Delta A - 0.1301) \div W \end{aligned}$$

(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1 μmol 氮定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GLS } (\mu\text{mol/h}/10^4\text{cell}) &= 363.1 \times (\Delta A - 0.1301) \div (500 \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.7262 \times (\Delta A - 0.1301) \end{aligned}$$

V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 1h; 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。

b. 用96孔板测定的计算公式如下

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1 μmol 氮定义为一个酶活力单位。

$$\text{GLS } (\mu\text{mol/h/mL}) = 726.2 \times (\Delta A - 0.1301) \div T = 726.2 \times (\Delta A - 0.1301)$$

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1 μmol 氮定义为一个酶活力单位。

$$\text{GLS } (\mu\text{mol/h /mg prot}) = 726.2 \times (\Delta A - 0.1301) \div \text{Cpr} \div T = 726.2 \times (\Delta A - 0.1301) \div \text{Cpr}。$$

(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1 μmol 氮定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GLS } (\mu\text{mol /h /g 鲜重}) &= 726.2 \times (\Delta A - 0.1301) \div (W \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 726.2 \times (\Delta A - 0.1301) \div W。 \end{aligned}$$

(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1 μmol 氮定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GLS } (\mu\text{mol/h}/10^4\text{cell}) &= 726.2 \times (\Delta A - 0.1301) \div (500 \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 1.4524 \times (\Delta A - 0.1301) \end{aligned}$$

V 样总：加入提取液体积，1 mL； T：反应时间，1h； 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