

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K660-M

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(440-460 nm)

Elabscience®谷氨酰胺酶(GLS)比色法测试盒

Glutaminase (GLS) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、动植物组织样本中的谷氨酰胺酶(GLS)的活力。

检测原理

在谷氨酰胺酶的作用下，谷氨酰胺被分解产生谷氨酸和氨，谷氨酸进一步在谷氨酸脱氢酶的催化下氧化脱氢生成 α -酮戊二酸，同时 NAD^+ 被还原生成 NADH ， NADH 在递氢物质作用下使WST-8显橙黄色，通过450 nm下测定吸光值变化可测得谷氨酰胺酶活性。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司BCA试剂盒(货号E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	底物 A (Substrate A)	粉剂×2 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂二 (Reagent 2)	标准品 (Standard)	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂三 (Reagent 3)	稀释液 (Diluent)	4 mL×1 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂五 (Reagent 5)	缓冲液 (Buffer Solution)	20 mL×1 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂六 (Reagent 6)	底物 B (Substrate B)	粉剂×2 支	-20° C 避光 保存 3 个月
试剂七 (Reagent 7)	促进剂 (Accelerator)	粉剂×1 支	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂八 (Reagent 8)	显色剂 (Chromogenic Agent)	1.5 mL×2 支	-20°C 避光 保存 3 个月
	96 孔酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	

	样本位置标记表	1 张	
--	---------	-----	--

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪 (440-460 nm，最佳检测波长 450 nm)，恒温箱(37°C)

试剂：PBS (0.01 mol/L，pH 7.4)

试剂准备

① 检测前，试剂四置于冰盒上待用。试剂盒中的其它试剂平衡至室温。

② 试剂一工作液配制：

取一瓶试剂一加入5 mL双蒸水，充分溶解混匀待用，未用完部分可-20°C可保存3天。

③ 50 mmol/L标准品储备液配制：

取一支试剂二用1 mL试剂三充分溶解，得到50 mmol/L的标准品溶液，混匀待用，未用完部分可2-8°C保存3天。

④ 0.5 mmol/L标准品溶液配制：

按50 mmol/L标准品储备液：双蒸水=1: 99的体积比配制得到0.5 mmol/L标准品溶液，现配现用，按需配制。

⑤ 试剂四工作液的配制：

取一支试剂四加入200 μ L双蒸水溶解，置于冰盒上待用，未用完部分2-8°C避光6 h内用完。

⑥ 试剂六工作液的配制：

每支试剂六用0.4 mL试剂三充分溶解，未用完部分分装后-20°C避光保存3天，禁止反复冻融。

⑦ 试剂七工作液的配制:

取一支试剂七用1 mL双蒸水充分溶解待用,未用完部分可-20°C避光保存3天。

⑧ 反应工作液的配制:

按照试剂四工作液:试剂五:试剂六工作液:试剂七工作液=10:690:37:10的体积比进行配制,充分混匀,置于冰盒上待用,现配现用,按需配置,配好的工作液在1 h内用完。

⑨ 不同浓度标准品的稀释:

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	0	0.1	0.15	0.2	0.3	0.4	0.45	0.5
0.5 mmol/L 标准品(μ L)	0	40	60	80	120	160	180	200
双蒸水(μ L)	200	160	140	120	80	40	20	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本：直接测定(若样本浑浊，可 $8000 \times g$ 离心 10 min 后使用)。

组织样本：组织用 PBS 清洗 3 次后使用 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 匀浆，若离心后上清液浑浊，可将上清反复离心后使用，留取部分上清样本测蛋白浓度。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择 2-3 个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.003-18 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝组织	不稀释	10%大鼠脑组织	不稀释
10%小鼠肾组织	不稀释	10%大鼠肝组织	不稀释
10%大鼠心组织	不稀释	10%大鼠肾组织	不稀释
人血清	不稀释	人血浆	1-3

注：稀释液为 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)。

实验关键点

- ① 试剂七工作液使用前分装出一部分，避免污染。
- ② 显色反应孵育过程需避光。

操作步骤

酶促反应

- ① 测定管：取 20 μL 样本加入对应 1.5 mL EP 管中；
对照管：取 20 μL 样本加入对应 1.5 mL EP 管中。
- ② 向步骤①中的测定管加入 80 μL 试剂一工作液，对照管加入 80 μL 双蒸水。
- ③ 混匀，37°C 孵育 30 min。
- ④ 室温，8000 $\times g$ 离心 5 min，上清用于第二步显色反应。

显色反应

- ① 标准孔：取 50 μL 不同浓度标准品加入对应酶标孔中；
测定孔：取 50 μL 步骤④中的测定管反应液加入到对应酶标孔中；
对照孔：取 50 μL 步骤④中的对照管反应液加入到对应酶标孔中。
- ② 向步骤⑤各孔加入 140 μL 反应工作液。
- ③ 向步骤⑥各孔加入 20 μL 试剂八。
- ④ 振板 3 s，37°C 避光孵育 20 min，酶标仪波长 450 nm 处测定各孔吸光度。

操作表

酶促反应

	测定管	对照管
样本(μL)	20	20
双蒸水(μL)	--	80
试剂一工作液(μL)	80	--
混匀, 37°C 孵育 30 min。		
室温, 8000 \times g 离心 5 min, 上清用于第二步显色反应。		

显色反应

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	50	--	--
测定管反应液(μL)	--	50	--
对照管反应液(μL)	--	--	50
反应工作液(μL)	140	140	140
试剂八(μL)	20	20	20
振板 3 s, 37°C 避光孵育 20 min, 酶标仪波长 450 nm 处测定各孔吸光度。			

本试剂盒检测组织样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用本公司 **BCA** 试剂盒(货号 **E-BC-K318-M**)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

组织样本中 GLS 活力计算公式:

定义: 37 ℃ 条件下, 每克组织蛋白每分钟水解谷氨酰胺生成 1 μmol 谷氨酸所需要的 GLS 酶量为一个活力单位。

$$\text{GLS 酶活} \quad (\text{U/gprot}) = (\Delta A_{450} - b) \div a \div T \div C_{pr} \div \frac{V_1}{V_2} \times f \times 1000^*$$

血清(浆)样本中 GLS 活力计算公式:

定义: 37 ℃ 条件下, 每升液体样本每分钟水解谷氨酰胺生成 1 μmol 谷氨酸所需要的 GLS 酶量为一个活力单位。

$$\text{GLS 酶活} \quad (\text{U/L}) = (\Delta A_{450} - b) \div a \div T \div \frac{V_1}{V_2} \times f \times 1000^*$$

注解:

y: 标准品孔 OD 值-空白孔 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA_{450} : 样本测定孔 OD 值-样本对照孔 OD 值

T: 酶促反应时间, 30 min

C_{pr} : 组织样本蛋白浓度: gprot/L

V_1 : 显色反应体系中加入酶促反应液的体积, 50 μL

V_2 : 酶促反应的总体积, 100 μL

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

1000*: 单位换算, 1 mmol=1000 μmol

附录1 关键数据

1. 技术参数

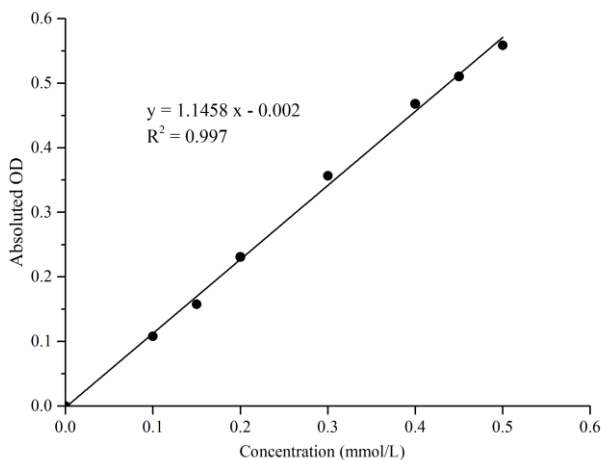
检测范围	0.003-18.0 U/L	平均批间差	8.3 %
灵敏度	0.003 U/L	平均批内差	5.0 %

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量50 μ L，按照操作步骤进行实验，各点OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	0	0.1	0.15	0.2	0.3	0.4	0.45	0.5
OD 值	0.066	0.173	0.228	0.295	0.426	0.528	0.585	0.639
	0.067	0.176	0.220	0.300	0.420	0.541	0.569	0.611
平均 OD 值	0.067	0.175	0.224	0.298	0.423	0.535	0.577	0.625
绝对 OD 值	0.000	0.108	0.158	0.231	0.357	0.468	0.511	0.559

②按上表数据绘制标准曲线，如下图所示：



附录2 实例分析

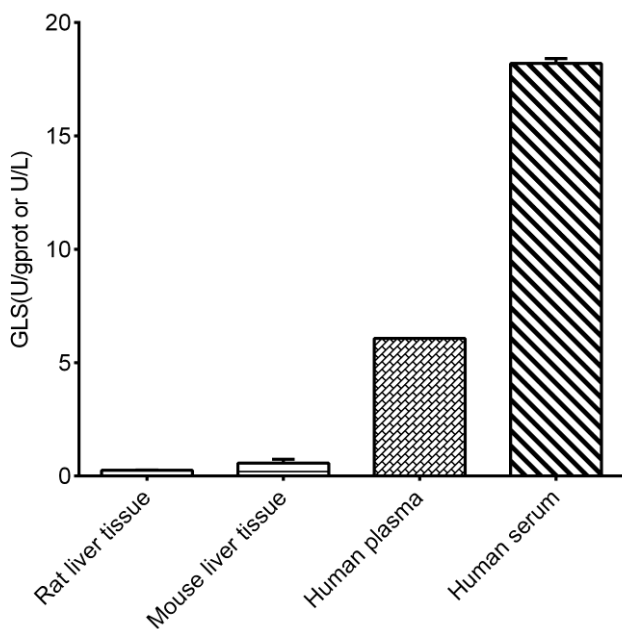
例如检测大鼠肝组织(数据仅供参考):

取10%大鼠肝组织样本20 μL , 按操作表操作, 结果如下:

标准曲线: $y = 1.1458x - 0.002$, 样本对照孔平均OD值为0.103, 样本测定孔平均OD值为0.136, 10%大鼠肝脏组织匀浆蛋白浓度为6.58 gprot/L, 计算结果为:

$$\text{GLS 活力 (U/gprot)} = (0.136 - 0.103 + 0.002) \div 1.1458 \div 30 \div 6.58 \div \frac{50}{100} \times 1000 = 0.309 \text{ U/gprot}$$

按照说明书操作, 测定大鼠肝脏组织(10%组织匀浆, 蛋白浓度为6.58 gprot/L, 加样量20 μL)、小鼠肝脏组织(10%组织匀浆, 蛋白浓度为6.68 gprot/L, 加样量20 μL)、人血浆(加样量20 μL)和人血清(加样量20 μL)中GLS活力(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
标准品测不出值	标准品放置时间过长	重新配制标准品溶液
样本测不出值	样本浓度低或者稀释倍数较大	增加上样量或重新匀浆提高匀浆浓度
	样本匀浆液放置时间过长	重新处理样本

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Tseng S.Ja. An acid degradable, lactate oxidizing nanoparticle formulation for non-small cell lung cancer virotherapy[J]. *Nano Today*. IF:18.962
2. Salman T M, Iyanda M A, Alli-Oluwafuyi A M, et al. Telfairia occidentalis stimulates hepatic glycolysis and pyruvate production via insulin-dependent and insulin-independent mechanisms[J]. *Metabolism Open*, 2021, 10(1-10):100092. IF:8.694
3. Zhang Y, Wang Z, Shi B, et al. Effect of gingival mesenchymal stem cell-derived exosomes on inflammatory macrophages in a high-lipid microenvironment[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 94(9499):107455. IF:4.932
4. Alsayyah A, ElMazoudy R, Al-Namshan M, et al. Chronic neurodegeneration by aflatoxin B1 depends on alterations of brain enzyme activity and immunoexpression of astrocyte in male rats[J]. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2019, 182: 109407. IF:4.527
5. Faheem M. Synthesis and Biological Evaluation of Benzimidazole Derivatives as Potential Neuroprotective Agents in an Ethanol-Induced Rodent Model[J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2021, 12(3):489–505. IF:4.418
6. Ren F , Xu X , Xu J B , et al. Compound essential oils relieve oxidative stress caused by PM 2. 5 exposure by inhibiting autophagy through the AMPK / mTOR pathway[J]. *Environmental Toxicology*, 2021 Sep; 36(9):1765-1774. IF:4.119
7. Mohsin Alvi A, Tariq Al Kury L, Umar Ijaz M, et al. Post-Treatment of Synthetic Polyphenolic 1, 3, 4 Oxadiazole Compound A3, Attenuated Ischemic Stroke-Induced Neuroinflammation and Neurodegeneration[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(6): 816. IF:4.082
8. Darband S G, Sadighparvar S, Yousefi B, et al. Quercetin attenuated oxidative DNA damage through NRF2 signaling pathway in rats with DMH induced colon carcinogenesis[J]. *Life sciences*, 2020(253-). IF:3.708
9. Shah F A, Ali T, Khan A U. Potent Natural Antioxidant Carveol Attenuates MCAO-induced Oxidative stress, Neurodegeneration by Regulating the Nrf-2 pathway[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2020, 14: 659. IF:3.707
10. Amany Abdel-Rahman Mohamed , Safaa I. Khater , Ahmed Hamed Arisha , et al. Chitosan-stabilized selenium nanoparticles alleviate cardio-hepatic damage in type 2 diabetes mellitus model via regulation of caspase, Bax/Bcl-2, and Fas/FasL-pathway[J]. *Gene*, 2020, 768(7):145288. IF:3.688