

土壤谷氨酰胺酶(solid-glutaminase, S- GLS) 活性测定试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

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:

S-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、甲苯、冰和双蒸水。

试剂组成和配制:

试剂一: 液体×1 瓶, 15 mL, 4 °C 保存;

试剂二: 粉剂×1 瓶, 4 °C 保存; 临用前加入 50mL 蒸馏水充分溶解待用; 用不完的试剂 4°C 保存;

试剂三: 液体×1 瓶, 60 mL, 常温保存;

试剂四: 液体×1 瓶, 5 mL, 常温保存;

试剂五: 液体×1 瓶, 3 mL, 常温保存;

试剂六: 液体×1 瓶, 3 mL, 常温避光保存。

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	测定管	对照管
样本 (g)	0.1	
甲苯 (uL)	25	25
振荡混匀, 室温放置 15min		
试剂一 (uL)	100	100
试剂二 (uL)	400	400
混匀, 37°C 水浴 2 小时		
试剂三 (uL)	525	525
混匀, 8000 g, 25°C 离心 10 min; 取上清液, 依次加入下列试剂		
上清液 (uL)	130	130
试剂四 (uL)	30	30
试剂五 (uL)	20	20
试剂六 (uL)	20	20

混匀, 室温静置 15min, 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。

注意: 试剂六如出现沉淀, 静置后取上清使用。

酶活性计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 3.8488x + 0.0057$ ；x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)，y 为吸光值 A。

单位定义：每 g 土样每 min 催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

$\text{S-GLS (nmol/min/g 土样)} = (\Delta A - 0.0057) \div 3.8488 \times V \text{ 反总} \div W \div T = 2.27 \times (\Delta A - 0.0057) \div W$ 。

V 反总：反应体系总体积：1.05mL；T：反应时间，2h=120min；W：样本质量，g；1000， μmol 到 nmol 换算系数。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 1.9244x + 0.0057$ ；x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)，y 为吸光值 A。

单位定义：每 g 土样每 min 催化谷氨酰胺生成 1nmol 氨定义为一个酶活力单位。

$\text{S-GLS (nmol/min/g 土样)} = (\Delta A - 0.0057) \div 1.9244 \times V \text{ 反总} \div W \div T = 4.55 \times (\Delta A - 0.0057) \div W$ 。

V 反总：反应体系总体积：0.525mL；T：反应时间，2h=120min；W：样本质量，g；1000， μmol 到 nmol 换算系数。