

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

注 意：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：

试剂一×1 瓶，15 mL，4 ℃保存；

试剂二×1 瓶，40 mL，4 ℃保存；

试剂三×1 瓶，60 mL，常温保存；

试剂四×1 瓶，5 mL，常温保存；

试剂五×1 瓶，3 mL，常温保存；

试剂六×1 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 (uL)	测定管	对照管
样本	0.1	
甲苯	25	25
振荡混匀，室温放置 15min		
试剂一	100	100
试剂二	400	400

混匀，37℃水浴 2 小时

试剂三	525	525
-----	-----	-----

混匀，8000 g，25℃离心 10 min；取上清液，依次加入下列试剂

上清液	130	130
试剂四	30	30
试剂五	20	20
试剂六	20	20

混匀，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， $2\text{h}=120\text{min}$ ； 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， $2\text{h}=120\text{min}$ ； W ：样本质量， g ； 1000 ， μmol 到 nmol 换算系数。