

谷氨酰胺(Gln)含量检测试剂盒

中文名称：谷氨酰胺(Gln)含量检测试剂盒

英文名称：Glutamine (Gln)Content Assay Kit

产品包装：盒装

产品规格：50T/48S

储存条件：-20℃

检测方法：可见分光光度法

有效期：6个月

自备试剂：该试剂盒实验过程中需自备试剂，详情见网站说明书

产品简介：谷氨酰胺(Glutamine)简称 Gln，是谷氨酸的酰胺，是组成蛋白质的重要氨基酸之一，同时谷氨酰胺也是三羧酸循环中 α -酮戊二酸的主要来源。谷氨酰胺在生物体内以游离态和结合态两种状态存在，游离的谷氨酰胺是在生物体代谢中起着重要作用，其代谢占细胞和血液循环中自由氨基酸的 60%以上。

游离谷氨酰胺在谷氨酰胺酶的催化作用下转变为谷氨酸，谷氨酸脱氢酶(GDH)催化谷氨酸和 NAD 生成 α -酮戊二酸、NADH 和 NH_4^+ ，在 1-mPMS 作用下，WST 可与 NADH 反应，产生水溶性 formazan，其在 450nm 处有大吸收峰，据此可计算谷氨酸含量。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 70mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 15mL×1 瓶(自备)	2-8℃保存
试剂一	液体 3mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 瓶	-20℃保存

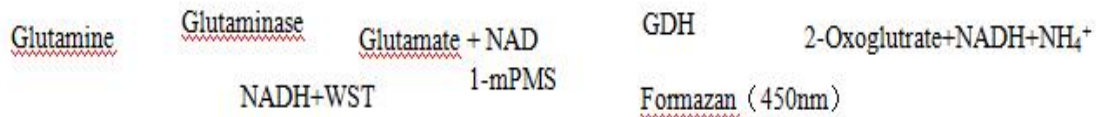
试剂三	液体 10mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂六	液体 8mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

1. 提取液二：氯仿，需自备。
2. 试剂二：试剂质量很小，有可能肉眼观察不到，直接使用即可。临用前取一支加入 0.2mL 蒸馏水，-20℃分装可保存 4 周，避免反复冻融。
3. 试剂二工作液：提供一空棕色试剂瓶。根据样本量按试剂二：蒸馏水=0.2mL：2.8mL(约 18S)的比例进行稀释，现用现配，使用时置于冰上。
4. 试剂四：临用前加入 40mL 提取液一，用不完的试剂分装后-20℃可保存 4 周。避免反复冻融。
5. 试剂五：临用前加入 2.5mL 试剂一，用不完的试剂分装后-20℃可保存 4 周，避免反复冻融，使用时置于冰上。
6. 标准品：10μmol/mL 谷氨酰胺标准液。

产品说明：

谷氨酰胺(Glutamine)简称 Gln，是谷氨酸的酰胺，是组成蛋白质的重要氨基酸之一，同时谷氨酰胺也是三羧酸循环中 α -酮戊二酸的主要来源。谷氨酰胺在生物体内以游离态和结合态两种状态存在，游离的谷氨酰胺是在生物体代谢中起着重要作用，其代谢占细胞和血液循环中自由氨基酸的 60%以上。游离谷氨酰胺在谷氨酰胺酶的催化作用下转变为谷氨酸，谷氨酸脱氢酶(GDH)催化谷氨酸和 NAD 生成 α -酮戊二酸、NADH 和 NH_4^+ ，在 1-mPMS 作用下，WST 可与 NADH 反应，产生水溶性 formazan，其在 450nm 处有吸收峰，据此可计算谷氨酰胺含量。



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：

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、氯仿、1mL 玻璃比色皿、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理(可适当调整待测样本量)

1. 组织：按照样本质量(g)：提取液一体积(mL)为 1:5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液一)加入提取液一，冰浴匀浆；12000g4℃离心 5min，取上清加入 500μL 提取液二，剧烈振荡 5min，12000g4℃离心 5min，取上层液体(呈清澈状态)置冰上待测(中层浑浊物质和下层液体不需要)。
2. 细菌或细胞样本：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(10⁴个)：提取液一体积(mL)为 500~1000:1 的比例(建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液一)加入提取液一，超声波破碎细菌或细胞(温度 4℃,功率 200W，超声 3s，间隔 7s，总时间 3min)，12000g4℃离心 5min，取上清加入 500μL 提取液二，剧烈振荡 5min，12000g4℃离心 5min，取上层液体(呈清澈状态)置冰上待测(中层浑浊物质和下层液体不需要)。
3. 血清(浆)等液体样本：取 500μL 样本加入 500μL 提取液二(若溶液浑浊则需先离心后取上清)，剧烈振荡 5min，12000g4℃离心 5min，取上层液体(呈清澈状态)置冰上待测(中层浑浊物质和下层液体不需要)。

注：如果需要测蛋白浓度，需在加提取液二之前测定蛋白浓度。

二、测定步骤：

1. 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，用蒸馏水调零。
2. 0.4 μ mol/mL 标准溶液的稀释：取 40 μ L 10 μ mol/mL 谷氨酰胺标准液，加入 960 μ L 蒸馏水，充分混匀，配制成 0.4 μ mol/mL 标准溶液使用，现用现配。(实验中每管需要 160 μ L，为减小实验误差，故配制大体积。)
3. 在 EP 管中按下表步骤加样

试剂名称(μ L)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	160	160	-	-
标准溶液	-	-	160	-
蒸馏水	-	-	-	160
试剂二工作液	160	-	160	160
试剂三	80	240	80	80
37°C酶促反应 1h				
试剂四	640	640	640	640
试剂五	40	40	40	40
试剂六	120	120	120	120

37°C避光反应 1h，12000g 常温离心 5min，吸取 1mL 上清，于 450nm 处测定吸光值，分别记为 A 测定、A 对照、A 标准、A 空白。分别计算 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照， ΔA 标准 = A 标准 - A 空白(标准管和空白管只需做 1-2 次，每个测定管需设置一个对照管)。 ΔA 测定的测定范围在 0.005-0.7 之间。

三、谷氨酰胺含量的计算

(1)按样本蛋白质浓度计算(蛋白浓度需自行测定)：

谷氨酰胺含量(μ mol/mgprot) = ΔA 测定 $\times C$ 标准 $\div \Delta A$ 标准 $\times V$ 样总 $\div (C_{pr} \times V$ 样总) = ΔA 测定 $\times 0.4 \div \Delta A$ 标准 $\div C_{pr}$ 。

(2)按样本质量计算：

谷氨酰胺含量($\mu\text{mol/g}$ 质量) = ΔA 测定 $\times C$ 标准 $\div \Delta A$ 标准 $\times V$ 样总 $\div W = \Delta A$ 测定 $\times 0.4 \div \Delta A$ 标准 $\div W$ 。

(3)按细菌/细胞数量计算:

谷氨酰胺含量($\mu\text{mol}/10^4\text{cell}$) = ΔA 测定 $\times C$ 标准 $\div \Delta A$ 标准 $\times V$ 样总 $\div N = \Delta A$ 测定 $\times 0.4 \div \Delta A$ 标准 $\div N$ 。

(4)按照液体体积计算:

谷氨酰胺含量($\mu\text{mol/mL}$) = ΔA 测定 $\times C$ 标准 $\div \Delta A$ 标准 = ΔA 测定 $\times 0.4 \div \Delta A$ 标准 C 标准: 标准溶液浓度, $0.4\mu\text{mol/mL}$; V 样总: 加入提取液一之后的样本体积, 1mL ; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL ; W : 样本质量, g ; N : 细胞数量, 万个。

注意事项:

- 1、如果需要测蛋白浓度, 需在加提取液二之前测定蛋白浓度。
- 2、如果离心后待测的上清依然浑浊, 可尝试加大离心转速或者延长时间, 例如 $12000g4^\circ\text{C}$ 离心 5min 。
- 3、 ΔA 测定的测定范围在 $0.005-0.7$ 之间。如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以用蒸馏水稀释样本后再次测定, 如果测定吸光值小于线性范围吸光值, 需要增加样本量后再次测定, 注意同步计算公式。

实验实例:

1. 取 0.1468g 草莓, 将样本进行前处理, 用蒸馏水稀释 2 倍后按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测定吸光度并计算 A 测定 $= 0.535$, A 对照 $= 0.1$, ΔA 测定 $= 0.435$, A 标准 $= 0.547$, A 空白 $= 0.067$, ΔA 标准 $= 0.48$ 。按样本质量计算 Gln 含量得: 谷氨酰胺含量($\mu\text{mol/g}$ 质量) = ΔA 测定 $\times 0.4 \div \Delta A$ 标准 $\div W \times 2 = 4.939\mu\text{mol/g}$ 质量。

2. 取 0.12g 兔肌肉, 将样本进行前处理, 用蒸馏水稀释 2 倍后按照测定步骤操作, 用 1mL

玻璃比色皿测定吸光度并计算 A 测定=0.351, A 对照=0.136, ΔA 测定=0.215, A 标准=0.547, A 空白=0.067, ΔA 标准=0.48。按样本质量计算 Gln 含量得: 谷氨酰胺含量($\mu\text{mol/g}$ 质量)= ΔA 测定 $\times 0.4 \div \Delta A$ 标准 $\div W \times 2 = 2.986 \mu\text{mol/g}$ 质量。

3. 取 0.5mL 羊血清, 按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测定吸光度并计算 A 测定=0.402, A 对照=0.253, ΔA 测定=0.149, A 标准=0.547, A 空白=0.067, ΔA 标准=0.48。按液体体积计算 Gln 含量得: 谷氨酰胺含量($\mu\text{mol/mL}$)= ΔA 测定 $\times 0.4 \div \Delta A$ 标准 $\div W = 0.124 \mu\text{mol/mL}$ 。

mlbio 酶联生物
Good elisakit producers