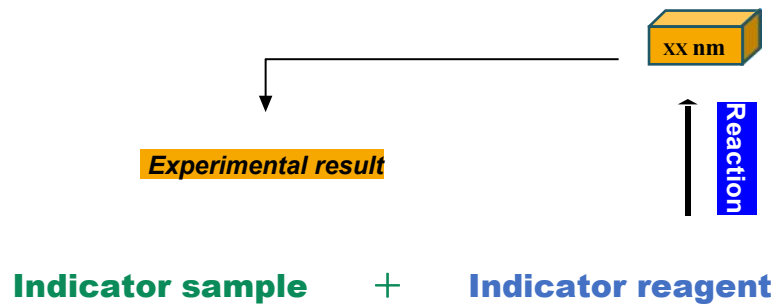


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

谷氨酰胺 (Gln) 含量检测试剂盒说明书 微量法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系工作人员。

试剂盒组成

试剂名称	规格	保存条件	使用方法及注意事项
提取液一	液体 80mL×1 瓶	2-8℃保存	
提取液二	液体 30mL×1 瓶 (自备)	2-8℃保存	
试剂一	液体 2mL×1 瓶	2-8℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体 5mL×1 瓶	2-8℃保存	
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃保存	
试剂五	粉剂×1 支	-20℃保存	
试剂六	液体 4mL×1 瓶	2-8℃保存	
标准品	液体 1mL×1 支	2-8℃保存	

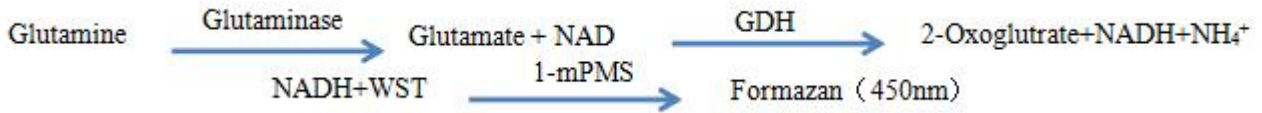
溶液的配制：

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：根据样本量按试剂二：蒸馏水=0.05mL：0.7mL（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 20mL 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 1.5mL 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处有最大吸收峰，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：

酶标仪/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、96孔板/微量玻璃比色皿、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织：按照样本质量（g）：提取液一（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；12000g 4°C离心5min，取上清加入500 μ L提取液二，剧烈振荡5min，12000g 4°C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（ 10^4 个）：提取液一（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°C，功率200W，超声3s，间隔7s，总时间3min），12000g 4°C离心5min，取上清加入500 μ L提取液二，剧烈振荡5min，12000g 4°C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500 μ L样本加入500 μ L提取液二（若溶液浑浊则需先离心后取上清），剧烈振荡5min，12000g 4°C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、酶标仪/可见分光光度计预热30min以上，调节波长至450nm，可见分光光度计用蒸馏水调零。
- 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40 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 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	40	40	-	-
标准液	-	-	40	-
蒸馏水	-	-	-	40
试剂二工作液	40	-	40	40
试剂三	20	60	20	20
37°C酶促反应 1h				
试剂四	160	160	160	160
试剂五	10	10	10	10
试剂六	30	30	30	30

37°C避光反应 1h，12000g 常温离心 5min，吸取 200μL 上清，于 450nm 处测定吸光值，分别记为 $A_{\text{测定}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{空白}}$ 。分别计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ （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）。 $\Delta A_{\text{测定}}$ 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）：

$$\text{谷氨酰胺含量} (\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = \Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样总}}) = \Delta A_{\text{测定}} \times 0.4 \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算：

$$\text{谷氨酰胺含量} (\mu\text{mol}/\text{g 质量}) = \Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样总}} \div W = \Delta A_{\text{测定}} \times 0.4 \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$$

(3) 按细菌/细胞数量计算：

$$\text{谷氨酰胺含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{cell}) = \Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样总}} \div N = \Delta A_{\text{测定}} \times 0.4 \div \Delta A_{\text{标准}} \div N$$

(4) 按照液体样本体积计算：

$$\text{谷氨酰胺含量} (\mu\text{mol}/\text{mL}) = \Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}} = \Delta A_{\text{测定}} \times 0.4 \div \Delta A_{\text{标准}}$$

$C_{\text{标准}}$ ：标准溶液浓度，0.4μmol/mL； $V_{\text{样总}}$ ：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 12000g 4°C 离心 5min。
- 3、 $\Delta A_{\text{测定}}$ 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。