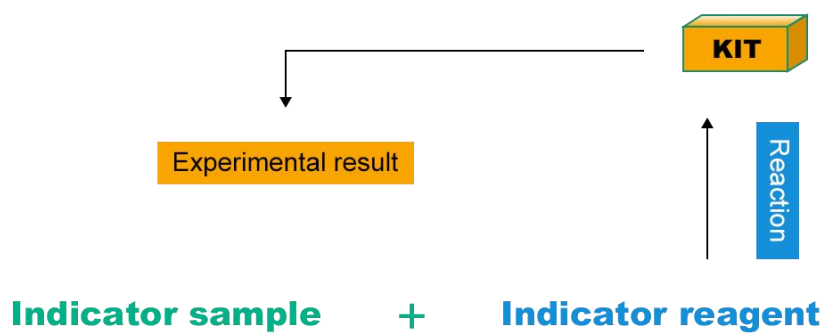


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0974

Size: 100T/48S

谷氨酰胺 (Glutamine, Gln) 检测试剂盒说明书

微板法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

一、测定意义:

谷氨酰胺 (Gln) 是一种含量较丰富的氨基酸, 它是通过谷氨酸和氨的缩合反应生成的, 是一种非必需氨基酸: 其在蛋白质合成, 酸碱平衡, 合成代谢过程中起重要作用。本试剂盒提供一种快速、灵敏的检测谷氨酸的方法, 利用谷氨酰胺酶使谷氨酰胺生成谷氨酸, 再通过谷氨酸脱氢酶特异作用于谷氨酸, 同时使生成的物质进一步与显色剂反应生成黄色物质, 该黄色物质在 450nm 处有最大吸收峰, 进而得出谷氨酰胺 (Gln) 的含量。

二、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 60mLx1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 1mLx1 支	-20℃保存	使用前甩几下或 4℃离心使液体落入试管底部, 加入 0.3mL 蒸馏水混匀, 分装后-20℃保存。
试剂二	液体 0.5mLx1 支	4℃保存	
试剂三	液体 7mLx1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉体 mgx1 支	-20℃保存	使用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部, 再加 1.2mL 蒸馏水溶解, 仍-20℃保存。
试剂五	粉体 mgx1 支	-20℃保存	使用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部, 再加 1.1mL, 蒸馏水溶解, 可分装后-20℃保存。

试剂六	液体 1mLx1 支	4℃保存	
试剂七	液体 10mLx1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 mgx1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、水浴锅、冰、蒸馏水。

四、谷氨酰胺(Gln)含量测定：

1、样本制备：

① 组织样本：0.1g 组织样本(水分充足的样本建议取 0.5g 左右)，加 1mL 的提取液研磨，粗提液全部转移到 EP 管中，12000rpm，离心 10min，上清液待测。

【注】：若离心后的上清液(一般高脂或高蛋白的样本如动物组织等)比较浑浊，可取出上清液转移至新 EP 管中再次或多次离心后取上清液测定；也可取上清液于 95℃孵育 5-10min 后离心取上清液测定。

②细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清：取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞(冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)：12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量(10^4)：提取液(ml)为 500~1000:1 的比例进行提取。

③ 液体样品：澄清的液体样本直接检测，若浑浊则 12000rpm，离心 10min 取上清液待测

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

②所有试剂解冻至室温(25℃)，或可放在 25℃条件下水浴 5-15min。

③ 试剂四和五和六和七可按照 10:10:10:100 比例配成混合液(一枪加 130uL 该混合液)(该混合液用多少配多少, 现配现用)。

④ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称(uL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	5	
试剂二		5
试剂三	45	45
混匀, 37° °C, 孵育 30min		
试剂四	10	10
试剂五	10	10
试剂六	10	10
试剂七	100	100
混匀, 37° °C (恒温培养箱)避光反应 30min(2min 内值不变, 否则需延长反应时间), 于 450nm 下读取吸光值 A, AA=A 测定-A 对照(每个样本需设置一个对照)。		

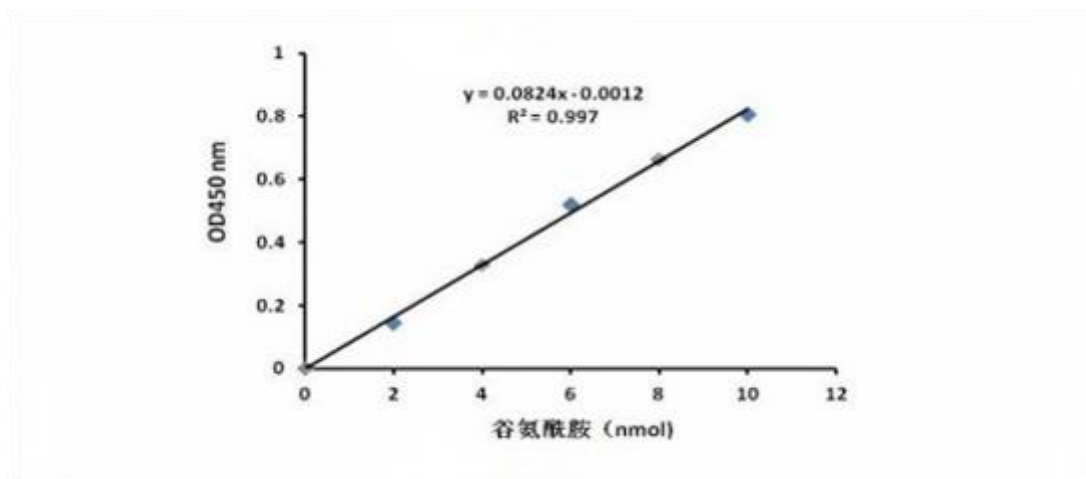
【注】:

1、若 A 值都大于 0.8 或样本含量有高背景值即谷氨酸含量高, 可对样本用蒸馏水进行稀释, 则稀释倍数 D 须代入公式计算。

2、 ΔA 低于 0.01, 则增加样本加样量 V1 (如由 20u 增至 50uL, 则试剂三相应减少), 或增加取样质量 W, 则改变后的 V1 和 W 则代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y=0.0824x-0.0012$: x 为谷氨酰胺含量(nmol), y 为 ΔA 。



2. 按照样本质量计算：

谷氨酰胺(Gln) (nmol/g 鲜重)

$$=[(\Delta A+0.0012) \div 0.0824] \div (W \times V1 \div V) \times D=606.8 \times (\Delta A+0.0012) \div W \times D$$

谷氨酰胺(Gln) (μ g/g 鲜重) =

$$[(\Delta A+0.0012) \div 0.0824] \div (W \times V1 \div V) \times Mr \times 10^{-3} \times D=88.68 \times (\Delta A+0.0012) \div W \times D$$

3、按细胞数量计算：

$$\text{谷氨酰胺(Gln) (nmol/10}^4\text{ cell)}=[(\Delta A+0.0012) \div 0.0824] \div (500 \times V1 \div V) \times D$$

$$=1.214 \times (\Delta A+0.0012) \times D$$

谷氨酰胺(Gln) (μ g/ 10^4 cell)

$$=[(\Delta A+0.0012) \div 0.0824] \div (500 \times V1 \div V) \times Mr \times 10^{-3} \times D=0.18 \times (\Delta A+0.0012) \times D$$

4、按照液体体积计算：

$$\text{谷氨酰胺 (Gln) (nmol/mL)} = [(\Delta A + 0.0012) \div 0.0824] \div V1 \times D = 606.8 \times (\Delta A + 0.0012) \times D$$

$$\text{谷氨酰胺 (Gln) (}\mu\text{g/mL)} = [(\Delta A + 0.0012) \div 0.0824] \div V1 \times Mr \times 10^{-3} \times D$$

$$= 88.68 \times (\Delta A + 0.0012) \times D$$

V——加入提取液体积，1mL；V1——加入反应体系中样本体积，0.02mL：

谷氨酰胺分子量 Mr——146.146：

D——稀释倍数，未稀释即为 1；

W——样本质量，g.

附：标准曲线制作过程：

1. 制备标准品母液 (100nmol/μL)：标准品用 1mL 蒸馏水溶解。(两天内用完且-20℃保存)
2. 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5nmol μL。
3. 依据测定管加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。