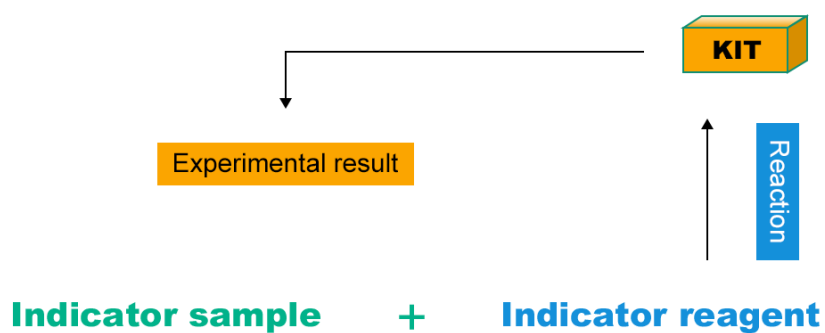


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0974

Size: 100T/48S

谷氨酰胺 (Gln) 含量检测试剂盒说明书

微量法

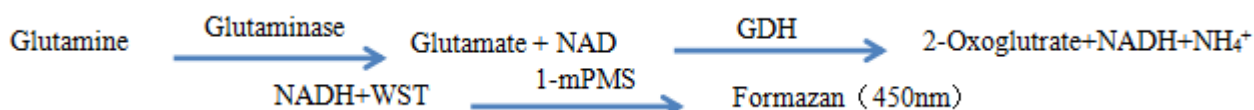
*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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。

二、测定原理:

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。

三、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。

四、试剂的组成和配置：

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	

五、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： 10 μmol/mL 谷氨酰胺标准液。

六、操作步骤:

● 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；12000g 4℃离心 5min，取上清加入 500μL 提取液二，剧烈振荡 5min，12000g 4℃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），12000g 4℃离心 5min，取上清加入 500μL 提取液二，剧烈振荡 5min，12000g 4℃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，12000g 4℃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。

七、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 μmol/mL 标准溶液的稀释：取 40 μL 10 μmol/mL 谷氨酰胺标准液，加入 960 μL 蒸馏水，充分混匀，配制成 0.4 μmol/mL 标准溶液使用，现用现配。（实验中每管需要 40 μL，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 200 μL 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 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ （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）。 ΔA 测定的测定范围在 0.005-0.7 之间。

八、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 (μmol/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:

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

(3) 按细菌/细胞数量计算:

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

(4) 按照液体样本体积计算:

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

C 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 ;
Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL ; W: 样本质量, g ; N: 细胞数量, 万个。

九、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 $12000\text{g } 4^{\circ}\text{C}$ 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。