

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°C

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

产品组成：

| 试剂名称 | 规格 | 保存条件 |
|------|-----------------|---------|
| 提取液一 | 液体 70mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 提取液二 | 液体 15mL×1 瓶(自备) | 2-8°C保存 |
| 试剂一 | 液体 3mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 试剂二 | 粉剂×2 瓶 | -20°C保存 |
| 试剂三 | 液体 10mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 试剂四 | 粉剂×1 瓶 | -20°C保存 |
| 试剂五 | 粉剂×1 瓶 | -20°C保存 |
| 试剂六 | 液体 8mL×1 瓶 | 2-8°C保存 |
| 标准品 | 液体 1mL×1 支 | 2-8°C保存 |

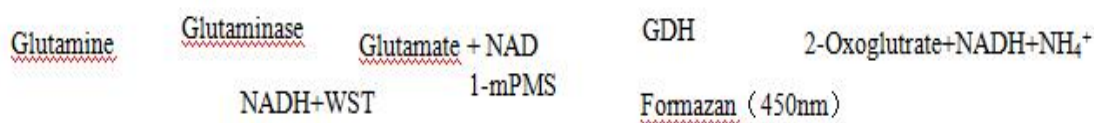
溶液的配制：

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°C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 NH₄⁺，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°C离心 5min, 取上清加入 500μL 提取液二, 剧烈振荡 5min, 12000g4°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°C, 功率 200W, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min), 12000g4°C离心 5min, 取上清加入 500μL 提取液二, 剧烈振荡 5min, 12000g4°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 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°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. 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. 0.4μmol/mL 标准溶液的稀释: 取 40μL 10μmol/mL 谷氨酰胺标准液, 加入 960μL 蒸馏水, 充分混匀, 配制成 0.4μmol/mL 标准溶液使用, 现用现配。(实验中每管需要 160μL, 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 | 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($\mu\text{mol}/\text{mgprot}$) = ΔA 测定 $\times C$ 标准 $\div \Delta A$ 标准 $\times V$ 样总 $\div (Cpr \times V$ 样总) = ΔA 测定 $\times 0.4 \div \Delta A$ 标准 $\div Cpr$ 。

(2)按样本质量计算:

谷氨酰胺含量($\mu\text{mol}/\text{g}$ 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($\mu\text{mol}/\text{mL}$) = 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 μ 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。

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 $^{\circ}$ 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(μ mol/g 质量)= ΔA 测定 $\times 0.4 \div \Delta A$ 标准 $\div W \times 2 = 4.939 \mu$ 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(μ mol/g 质量)= ΔA 测定 $\times 0.4 \div \Delta A$ 标准 $\div W \times 2 = 2.986 \mu$ 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(μ mol/mL)= ΔA 测定 $\times 0.4 \div \Delta A$ 标准 $\div W = 0.124 \mu$ mol/mL。

mlbio 酶联生物
Good elisakit producers