

谷氨酰胺(Gln)含量试剂盒

规格：微量法 48 样

检测原理：谷氨酰胺酶法

编号：ml301024

检测波长：450nm

注意：

正式测定前务必取 3 - 5 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

谷氨酰胺（Gln）是蛋白质合成的重要组成部分，在生物体内主要以游离态和结合态两种状态存在，游离谷氨酰胺在机体代谢过程中起着重要作用，同时也是三羧酸循环中 α -酮戊二酸的主要来源，在能量代谢中发挥重要作用，可通过糖酵解和三羧酸循环途径参与能量的产生与供应。

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-8 能够与 NADH 反应生成水溶性 Formazan，产物在 450 nm 处具有特征吸收峰，根据吸光值变化即可定量检测谷氨酰胺的含量。

自备实验用品及仪器：

台式离心机、酶标仪、96 孔板、可调式移液枪、研钵、恒温水浴锅/培养箱和蒸馏水。

试剂盒组分与配制：

提取液：液体 60 mL×1 瓶，4℃保存。

试剂一：液体 500μL×1 支，-20℃避光保存。使用时分装冻存，避免反复冻融。

试剂二：液体 500μL×1 支，4℃保存。

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃避光保存。临用前加入 5mL 蒸馏水混匀溶解，分装冻存，避免反复冻融。

试剂四：液体 1.5mL×1 瓶，-20℃避光保存。分装冻存，避免反复冻融。

试剂五：液体 1.5mL×1 瓶，-20℃避光保存。

试剂六：液体 1.5mL×1 瓶，-20℃避光保存。

试剂七：液体 12mL×1 瓶，4℃保存。

标准品：粉剂×1 瓶，4℃避光保存。

样品处理：

- 1. 细菌或培养细胞：**先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），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm, 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 2. 组织：**按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆。12000rpm,4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。（若离心后的上清液比较浑浊，可取出上清液至新 EP 管中再次或多次离心至上清液澄清，也可 95℃孵育 5-10min 后离心取上清液）。
- 3. 血清（浆）样品：**直接检测。

测定步骤：

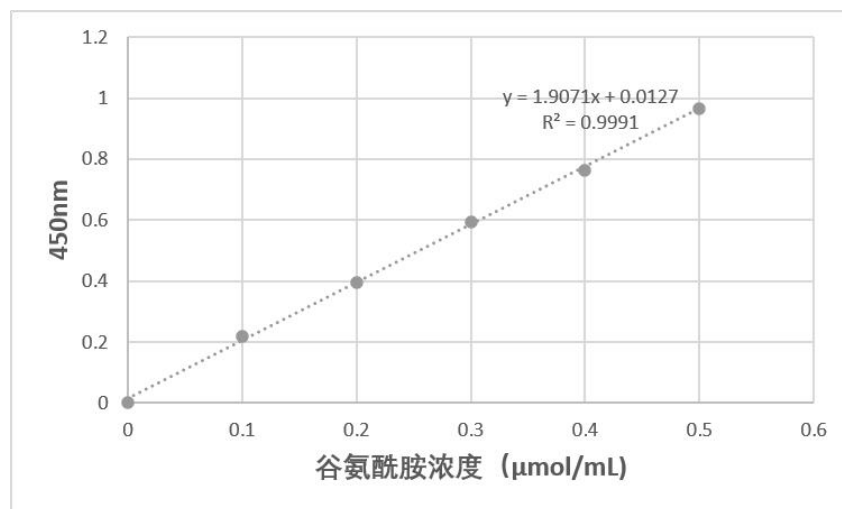
1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

2、在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	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℃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℃避光反应 30min(连续读数，观察 2min 内值不变，否则需延长反应时间)，于 450nm 下读取吸光值 A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

酶活性计算：

标准条件下测定的回归方程为 $y = 1.9071x + 0.0127$ ， $R^2 = 0.9991$ ；x 为标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$)，y 为吸光值 ΔA 。



1、血清 (浆) Gln 含量

$$\text{Gln}(\text{nmol} / \text{mL}) = (\Delta A - 0.0127) \div 1.9071 \times 1000$$

2、组织、细菌或细胞 Gln 含量

(1) 按样本蛋白浓度计算:

$$\text{Gln (nmol /mg prot)} = (\Delta A - 0.0127) \div 1.9071 \div \text{Cpr} \times 1000$$

(2) 按样本鲜重计算:

$$\text{Gln (nmol /g 鲜重)} = (\Delta A - 0.0127) \div 1.9071 \times V \text{ 样总} \div W \times 1000$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{Gln (nmol/ } 10^4 \text{ cell)} = (\Delta A - 0.0127) \div 1.9071 \times V \text{ 样总} \div \text{细胞数量} \times 1000$$

V 样总: 加入提取液体积, 1 mL;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

W: 样本质量, g;

细胞数量: 以万计;

1000: μmol 到 nmol 换算系数。

附: 标准曲线制作过程(选做)

1、在标准管中加入 1mL 蒸馏水混匀溶解即得 $10\mu\text{mol/mL}$ 谷氨酰胺。将 $10\mu\text{mol/mL}$ 谷氨酰胺用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品: 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, $0.1\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

2、依据以下测定步骤操作, 根据结果绘制标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	空白管
标准品	20	-
蒸馏水	-	20
试剂一	5	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避光反应 30min(连续读数, 观察 2min 内值不变, 否则需延长反应时间), 于 450nm 下读取吸光值 A, 计算 $\Delta A = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

3、以标准品浓度 (μmol/mL) 为横坐标 (x), 以其对应的 ΔA ($\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$)

为纵坐标 (y), 绘制拟合曲线, 即可得到线性方程 $y = kx + b$;

预实验的意义:

比色法检测试剂盒预实验非常重要

- 1、确定该试剂盒是否适合客户的样本检测, 以免造成试剂盒和样本的浪费 (比如低表达处理的样本);
- 2、熟悉生化试剂盒的操作流程, 尤其是初次使用生化试剂盒测定;
- 3、确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适;
- 4、了解实验过程中可能出现的实验现象或问题, 以便于及时作出调整;
- 5、通过 3 - 5 组预实验, 判断试剂盒对于样本的最佳适应稀释浓度范围, 指导实验样本稀释比例。