



## 谷氨酰胺(Gln)含量检测试剂盒(微量法)

中文名称：**谷氨酰胺(Gln)含量检测试剂盒(微量法)**

英文名称：Glutamine (Gln)Content Assay Kit

产品包装：盒装

产品规格：100T/48S

储存条件：-20℃

检测方法：微量法

有效期：6个月

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
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。

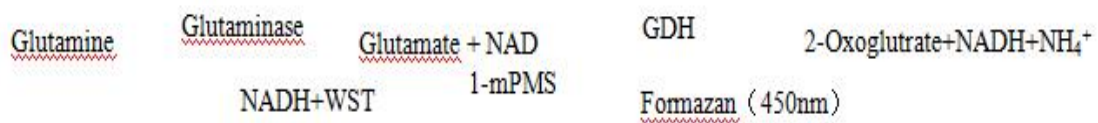
4. 试剂四：临用前加入 20mL 提取液一，用不完的试剂分装后-20°C可保存 4 周。避免反复冻融。

5. 试剂五：临用前加入 1.5mL 试剂一，用不完的试剂分装后-20°C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<sub>4</sub><sup>+</sup>，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：**

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)

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℃离心 5min，取上清加入 500μL 提取液二，剧烈振荡 5min，12000g4℃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)，12000g4℃离心 5min，取上清加入 500μL 提取液二，剧烈振荡 5min，12000g4℃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℃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、0.4μmol/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 40μL，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	-	-
标准溶液	-	-	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 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。

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(μmol/mgprot) =  $\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样总}}) = \Delta A_{\text{测定}} \times 0.4 \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$

(2) 按样本质量计算:

谷氨酰胺含量(μmol/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:

谷氨酰胺含量(μmol/10<sup>4</sup>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:

谷氨酰胺含量( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ )= $\Delta A$  测定 $\times C$  标准 $\div \Delta A$  标准= $\Delta A$  测定 $\times 0.4 \div \Delta A$  标准  
C 标准: 标准溶液浓度,  $0.4\mu\text{mol}/\text{mL}$ ; V 样总: 加入提取液一之后的样本体积,  $1\text{mL}$ ; Cpr: 样本蛋白质浓度,  $\text{mg}/\text{mL}$ ; 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  $12000g4^{\circ}\text{C}$  离心 5min。
- 3、 $\Delta A$  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  $0.1011\text{g}$  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, 96 孔板测得计算 A 测定= $0.37$ , A 对照= $0.1$ ,  $\Delta A$  测定= $0.27$ , A 标准= $0.466$ , A 空白= $0.094$ ,  $\Delta A$  标准= $0.372$ 。按样本质量计算 Gln 含量得: 谷氨酰胺含量( $\mu\text{mol}/\text{g}$  质量)= $\Delta A$  测定 $\times 0.4 \div \Delta A$  标准 $\div W \times 2 = 5.7433\mu\text{mol}/\text{g}$  质量。
2. 取  $0.1081\text{g}$  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, 96 孔板测得计算 A 测定= $0.349$ , A 对照= $0.147$ ,  $\Delta A$  测定= $0.202$ , A 标准= $0.466$ , A 空白= $0.094$ ,  $\Delta A$  标准= $0.372$ 。按样本质量计算 Gln 含量得: 谷氨酰胺含量( $\mu\text{mol}/\text{g}$  质量)= $\Delta A$  测定 $\times 0.4 \div \Delta A$  标准 $\div W \times 2 = 4.0186\mu\text{mol}/\text{g}$  质量。
3. 取  $0.5\text{mL}$  羊血清, 将样本用蒸馏水稀释 2 倍后按照测定步骤操作, 96 孔板测得计算 A 测定= $0.155$ , A 对照= $0.118$ ,  $\Delta A$  测定= $0.037$ , A 标准= $0.466$ , A 空白= $0.094$ ,  $\Delta A$  标准



=0.372。按样本质量计算 Gln 含量得：谷氨酰胺含量( $\mu\text{mol/mL}$ )= $\Delta A$  测定 $\times 0.4 \div \Delta A$  标准

$\div W \times 2 = 0.0796 \mu\text{mol/mL}$ 。