

## 谷氨酰胺(Glutamine, Gln)含量测定试剂盒说明书

(微板法 48 样)

## 一、产品简介:

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、试剂盒的组成和配制:

| 试剂名称 | 规格          | 保存要求   | 备注                                              |
|------|-------------|--------|-------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 60mL×1 瓶 | 4℃保存   |                                                 |
| 试剂一  | 液体 μL×1 支   | -20℃保存 | 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,可分装后-20℃保存。 |
| 试剂二  | 液体 7mL×1 瓶  | 4℃保存   |                                                 |
| 试剂三  | 粉体 mg×1 支   | -20℃保存 | 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     |
| 试剂四  | 粉体 mg×1 支   | -20℃保存 | 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,仍-20℃保存     |
| 试剂五  | 液体 1mL×1 支  | 4℃保存   |                                                 |
| 试剂六  | 液体 10mL×1 瓶 | 4℃保存   |                                                 |
| 标准品  | 粉体 mg×1 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、冰、蒸馏水。

## 四、谷氨酰胺(Gln)含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

## 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。

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℃)

③ 在 96 孔板中依次加入:

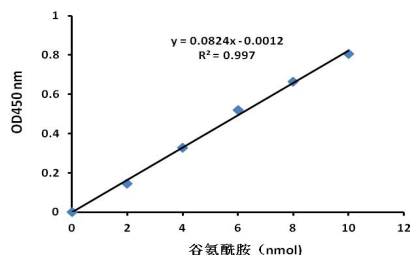
| 试剂名称 (μL)                                                                                                                          | 测定管 | 对照管 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 样本                                                                                                                                 | 20  | 20  |
| 试剂一                                                                                                                                | 5   |     |
| 试剂二                                                                                                                                | 45  | 50  |
| 混匀, 37°C, 孵育 30min                                                                                                                 |     |     |
| 试剂三                                                                                                                                | 10  | 10  |
| 试剂四                                                                                                                                | 10  | 10  |
| 试剂五                                                                                                                                | 10  | 10  |
| 试剂六                                                                                                                                | 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,<br>$\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (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、 $\Delta A$  低于 0.01, 则增加样本加样量 V1 (如由 20μL 增至 50μL, 则试剂二相应减少), 则改变后的 V1 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  $\Delta A$ 。



2、按照样本质量计算:

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

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

$$= 88.68 \times (\Delta A + 0.0012) \div W$$

3、按细胞数量计算:

$$\text{谷氨酰胺(Gln)(nmol/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0012) \div 0.0824] \div (500 \times V1 \div V) = 1.214 \times (\Delta A + 0.0012)$$

$$\text{谷氨酰胺(Gln)(μg/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 0.0012) \div 0.0824] \div (500 \times V1 \div V) \times Mr \times 10^{-3}$$

$$= 0.18 \times (\Delta A + 0.0012)$$

4、按照液体体积计算:

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

$$\text{谷氨酰胺(Gln)(μg/mL)} = [(\Delta A + 0.0012) \div 0.0824] \div V1 \times Mr \times 10^{-3} = 88.68 \times (\Delta A + 0.0012)$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入反应体系中样本体积, 0.02mL;

W---样本质量, g;

谷氨酰胺分子量 Mr---146.146。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (100nmol/μL): 标准品用 1mL 的蒸馏水溶解。(母液需在两天内用且-20°C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, 0.5. nmol/μL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。