

谷氨酰胺(Glutamine, Gln)含量测定试剂盒说明书

(货号: BP10373W 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 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 1 支	-20℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.2mL 蒸馏水溶解, 仍-20℃ 保存。
试剂四	粉体 1 支	-20℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 再加 1.1mL 蒸馏水溶解, 仍-20℃ 保存。
试剂五	液体 1.1mL×1 支	4℃ 避光保存	
试剂六	液体 15mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉体 1 支	4℃ 保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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、检测步骤:

- 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：

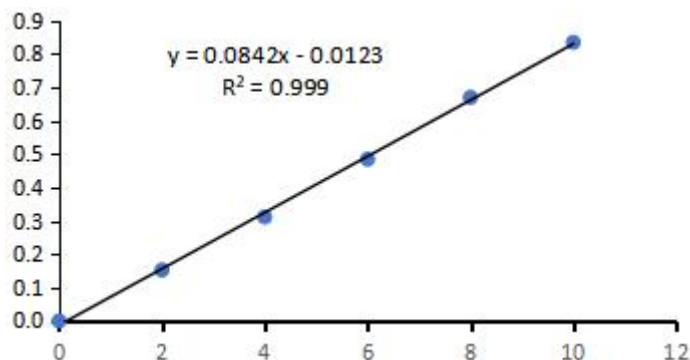
试剂组分（μL）	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	5	
试剂二	45	50
混匀，37℃，孵育 30min		
试剂三	10	10
试剂四	10	10
试剂五	10	10
试剂六	100	100
混匀，37℃（恒温培养箱）避光反应 30min，于 450nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本需设置一个对照）。		

【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、 ΔA 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 $y = 0.0842x - 0.0123$ ； x 为谷氨酰胺含量（nmol）， y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算：

$$\text{谷氨酰胺(Gln)}(\text{nmol/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0123) \div 0.0842] \div (W \times V1 \div V) = 593.8 \times (\Delta A + 0.0123) \div W$$

$$\begin{aligned} \text{谷氨酰胺(Gln)}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0123) \div 0.0842] \div (W \times V1 \div V) \times Mr \times 10^{-3} \\ &= 86.8 \times (\Delta A + 0.0123) \div W \end{aligned}$$

3、按样本蛋白浓度计算：

$$\text{谷氨酰胺(Gln)}(\text{nmol/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0123) \div 0.0842] \div (Cpr \times V1 \div V) = 593.8 \times (\Delta A + 0.0123) \div Cpr$$

$$\begin{aligned} \text{谷氨酰胺(Gln)}(\mu\text{g/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0123) \div 0.0842] \div (Cpr \times V1 \div V) \times Mr \times 10^{-3} \\ &= 86.8 \times (\Delta A + 0.0123) \div Cpr \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算：

$$\text{谷氨酰胺(Gln)}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0123) \div 0.0842] \div (500 \times V1 \div V) = 1.188 \times (\Delta A + 0.0123)$$

$$\begin{aligned} \text{谷氨酰胺(Gln)}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0123) \div 0.0842] \div (500 \times V1 \div V) \times Mr \times 10^{-3} \\ &= 0.174 \times (\Delta A + 0.0123) \end{aligned}$$

5、按照液体体积计算：

$$\text{谷氨酰胺(Gln)}(\text{nmol/mL}) = [(\Delta A + 0.0123) \div 0.0842] \div V1 = 593.8 \times (\Delta A + 0.0123)$$

$$\text{谷氨酰胺(Gln)}(\mu\text{g/mL})=[(\Delta A+0.0123)\div 0.0842]\div V1\times Mr\times 10^{-3}=86.8\times (\Delta A+0.0123)$$

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 标准品用 1mL 的蒸馏水溶解。(母液需在两天内用且-20℃保存)，标准品母液浓度为 100nmol/μL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. nmol/μL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

1. 吸取标准品母液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 10nmol/μL 的标品稀释液；						
2. 吸取 10nmol/μL 的标品稀释液 50uL，加入 950uL 蒸馏水，混匀得到 0.5nmol/μL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 nmol/μL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据测定管加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	20	
蒸馏水		20
试剂一	5	
试剂二	45	50
混匀，37℃，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℃ (恒温培养箱) 避光反应 30min，于 450nm 下读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		