

谷氨酰胺（Gln）含量检测试剂盒

微量法

货号：BC5305

规格：100T/48S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

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	自备试剂	-
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

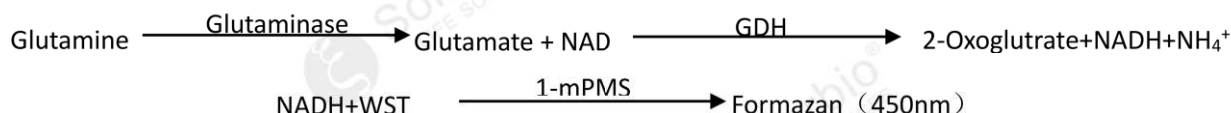
溶液的配制：

1. 提取液二：自备氯仿，大约需要 30mL，常温保存；试剂盒内提供一个 30mL 棕色空瓶，仅做分装使用，请自行标注试剂名称。
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（该试剂为冻干试剂，可能存在不同瓶间肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象，此现象不影响使用，实际质量相同）。
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℃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℃可保存 4 周。避免反复冻融，使用时置于冰上。
6. 标准品：10μmol/mL 谷氨酰胺标准品。

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 处有最大吸收峰，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。

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 (>98%, AR)、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，具体比例可以参考文献）

1. 组织：按照样本质量 (g)：提取液一 (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；12000g 4℃离心 5min，取上清加入 500μL 提取液二，剧烈振荡 5min，12000g 4℃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 (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），12000g 4℃离心 5min，取上清加入 500μL 提取液二，剧烈振荡 5min，12000g 4℃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，12000g 4℃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 标准品的稀释：取 40μL 10μmol/mL 谷氨酰胺标准品，加入 960μL 蒸馏水，充分混匀，配制成 0.4μmol/mL 标准品使用，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	-	-
标准品	-	-	40	-
蒸馏水	-	-	-	40
试剂二工作液	40	-	40	40
试剂三	20	60	20	20
37℃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℃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 $A_{\text{测定}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{空白}}$ 。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）。 $\Delta A_{\text{测定}}$ 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）：



本产品仅供科学研究使用。请勿用于临床、诊断、食品、化妆品检测等用途。

For research use only. Do not use for clinical, diagnostic, food, cosmetic testing and other purposes.

谷氨酰胺含量 ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$) = $\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样总}}) = \Delta A_{\text{测定}} \times 0.4 \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$

(2) 按样本质量计算:

谷氨酰胺含量 ($\mu\text{mol}/\text{g 质量}$) = $\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样总}} \div W = \Delta A_{\text{测定}} \times 0.4 \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$

(3) 按细菌/细胞数量计算:

谷氨酰胺含量 ($\mu\text{mol}/10^4\text{cell}$) = $\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样总}} \div N = \Delta A_{\text{测定}} \times 0.4 \div \Delta A_{\text{标准}} \div N$

(4) 按照液体样本体积计算:

谷氨酰胺含量 ($\mu\text{mol}/\text{mL}$) = $\Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}} = \Delta A_{\text{测定}} \times 0.4 \div \Delta A_{\text{标准}}$

$C_{\text{标准}}$: 标准品浓度, $0.4\mu\text{mol}/\text{mL}$; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液一之后的样本体积, 1mL ; C_{pr} : 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离心时间, 例如 $12000\text{g } 4^\circ\text{C}$ 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 0.1011g 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 $A_{\text{测定}} = 0.37$, $A_{\text{对照}} = 0.1$, $\Delta A_{\text{测定}} = 0.27$, $A_{\text{标准}} = 0.466$, $A_{\text{空白}} = 0.094$, $\Delta A_{\text{标准}} = 0.372$ 。按样本质量计算 Gln 含量得:
谷氨酰胺含量 ($\mu\text{mol}/\text{g 质量}$) = $\Delta A_{\text{测定}} \times 0.4 \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times 2 = 5.7433\mu\text{mol}/\text{g 质量}$ 。
2. 取 0.1081g 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 $A_{\text{测定}} = 0.349$, $A_{\text{对照}} = 0.147$, $\Delta A_{\text{测定}} = 0.202$, $A_{\text{标准}} = 0.466$, $A_{\text{空白}} = 0.094$, $\Delta A_{\text{标准}} = 0.372$ 。按样本质量计算 Gln 含量得:
谷氨酰胺含量 ($\mu\text{mol}/\text{g 质量}$) = $\Delta A_{\text{测定}} \times 0.4 \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times 2 = 4.0186\mu\text{mol}/\text{g 质量}$ 。
3. 取 0.5mL 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 $A_{\text{测定}} = 0.155$, $A_{\text{对照}} = 0.118$, $\Delta A_{\text{测定}} = 0.037$, $A_{\text{标准}} = 0.466$, $A_{\text{空白}} = 0.094$, $\Delta A_{\text{标准}} = 0.372$ 。按样本质量计算 Gln 含量得:
谷氨酰胺含量 ($\mu\text{mol}/\text{mL}$) = $\Delta A_{\text{测定}} \times 0.4 \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times 2 = 0.0796\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。

相关发表文献:

- [1] Luo C, Chen X, Bai Y, Xu L, Wang S, Yao L, Guo X, Wang D, Zhong X. Upregulation of Yin-Yang-1 Associates with Proliferation and Glutamine Metabolism in Esophageal Carcinoma. Int J Genomics. 2022 Mar 20;2022:9305081. doi: 10.1155/2022/9305081. PMID: 35359580; PMCID: PMC8961439.

参考文献:

- [1] Tsao M, Otter D E. Quantification of glutamine in proteins and peptides using enzymatic hydrolysis and reverse-phase high-performance liquid chromatography[J]. Analytical Biochemistry, 1999, 269(1):143-148.
- [2] Seegmiller J E, Schwartz R, Davidson C S. The plasma ammonia and glutamine content in patients with hepatic coma[J]. Journal of Clinical Investigation, 1954, 33(7), 984.

相关系列产品:

BC1550/BC1555 谷丙转氨酶 (GPT/ALT) 活性检测试剂盒





BC1560/BC1565 谷草转氨酶（GOT/AST）活性检测试剂盒

BC1570/BC1575 氨基酸（AA）含量检测试剂盒

BC1580/BC1585 谷氨酸（Glu）含量检测试剂盒

