



谷氨酰胺(Gln)含量试剂盒

规格：微量法 48 样

检测波长：450nm

编号：TW57765

检测原理：谷氨酰胺酶法

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 $\times$ 1 瓶，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。



试剂一：液体 500 μ L $\times$ 1 支，-20 $^{\circ}$ C避光保存。使用时分装冻存，避免反复冻融。

试剂二：液体 500 μ L $\times$ 1 支，4 $^{\circ}$ C保存。

试剂三：粉剂 $\times$ 1 瓶，-20 $^{\circ}$ C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 $\times$ 1 瓶，-20 $^{\circ}$ C避光保存。分装冻存，避免反复冻融。

试剂五：液体 1.5mL $\times$ 1 瓶，-20 $^{\circ}$ C避光保存。

试剂六：液体 1.5mL $\times$ 1 瓶，-20 $^{\circ}$ C避光保存。

试剂七：液体 12mL $\times$ 1 瓶，4 $^{\circ}$ C保存。

标准品：粉剂 $\times$ 1 瓶，4 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C孵育 5-10min 后离心取上清液)。

3. 血清 (浆) 样品：直接检测。

测定操作

1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

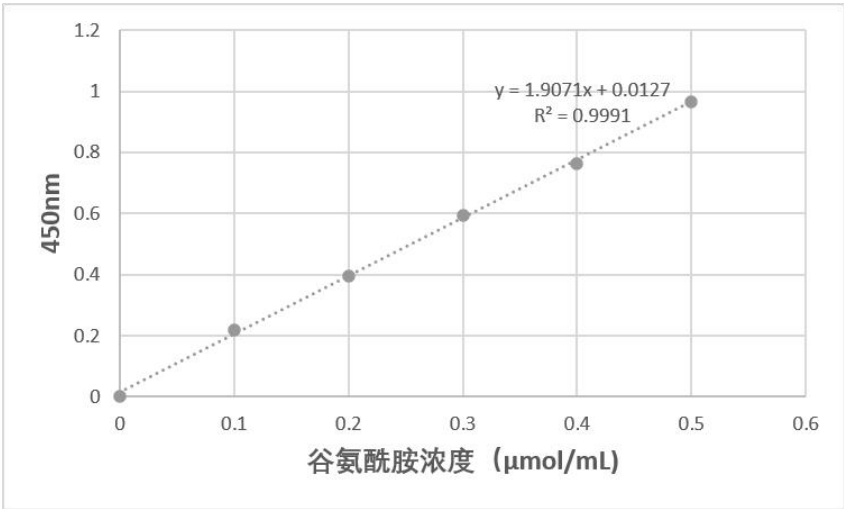
2、在 96 孔板中依次加入：



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 (μmol/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 10μmol/mL 谷氨酰胺。将 10μmol/mL 谷氨酰胺用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0.5，0.4，0.3，0.2，0.1μmol/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℃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 $\Delta A = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。		

3、以标准品浓度 ($\mu\text{mol/mL}$) 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。