

谷氨酰胺(Glutamine, Gln)含量测定试剂盒说明书

(分光法 24 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 30mL×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,再加入 1mL 蒸馏水混匀,可-20℃分装保存。
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 1.8mL 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 30mL×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:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、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 可见分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 450nm,蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温(25℃)

③ 在 EP 管中依次加入:

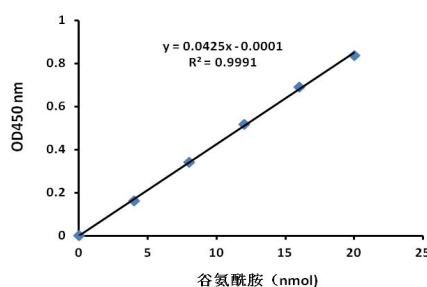
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	50	50
试剂一	30	
试剂二	80	110
混匀, 37°C, 孵育 30min		
试剂三	30	30
试剂四	20	20
试剂五	20	20
试剂六	500	500
混匀, 37°C (恒温培养箱) 避光反应 30min (2min 内值不变, 否则需延长反应时间), 于 450nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本需设置一个对照)。		

【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 50μL 增至 100μL, 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 $y = 0.0425x - 0.0001$; x 为谷氨酰胺含量 (nmol), y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

谷氨酰胺(Gln)(nmol/g 鲜重)=[$(\Delta A + 0.0001) \div 0.0425$] $\div (W \times V1 \div V)$ = $470.6 \times (\Delta A + 0.0001) \div W$

谷氨酰胺(Gln)(μg/g 鲜重)=[$(\Delta A + 0.0001) \div 0.0425$] $\div (W \times V1 \div V) \times Mr \times 10^{-3}$
= $68.8 \times (\Delta A + 0.0001) \div W$

3、按细胞数量计算:

谷氨酰胺(Gln)(nmol/ 10^4 cell)=[$(\Delta A + 0.0001) \div 0.0425$] $\div (500 \times V1 \div V)$ = $0.941 \times (\Delta A + 0.0001)$

谷氨酰胺(Gln)(μg/ 10^4 cell)=[$(\Delta A + 0.0001) \div 0.0425$] $\div (500 \times V1 \div V) \times Mr \times 10^{-3}$
= $0.14 \times (\Delta A + 0.0001)$

4、按照液体体积计算:

谷氨酰胺(Gln)(nmol/mL)=[$(\Delta A + 0.0001) \div 0.0425$] $\div V1$ = $470.6 \times (\Delta A + 0.0001)$

谷氨酰胺(Gln)(μg/mL)=[$(\Delta A + 0.0001) \div 0.0425$] $\div V1 \times Mr \times 10^{-3}$ = $68.8 \times (\Delta A + 0.0001)$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入反应体系中样本体积, 0.05mL;

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, 0.08, 0.16, 0.24, 0.32, 0.4. 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。