



## 谷氨酰胺(Gln)含量检测试剂盒

中文名称：[谷氨酰胺\(Gln\)含量检测试剂盒](#)

英文名称：Glutamine (Gln)Content Assay Kit

产品包装：盒装

产品规格：100T/48S

储存条件：-20°C

检测方法：微量法

有效期：6个月

自备试剂：该试剂盒实验过程中需自备试剂，详情见网站说明书

**产品简介：**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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -酮戊二酸、NADH 和  $\text{NH}_4^+$ ，在 1-mPMS 作用下，WST 可与 NADH 反应，产生水溶性 formazan，其在 450nm 处有吸收峰，据此可计算谷氨酸含量。

**产品组成：**

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 80mL×1 瓶	2-8°C保存
提取液二	液体 30mL×1 瓶(自备)	2-8°C保存



试剂一	液体 2mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂三	液体 5mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂五	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂六	液体 4mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8°C保存

#### 溶液的配制：

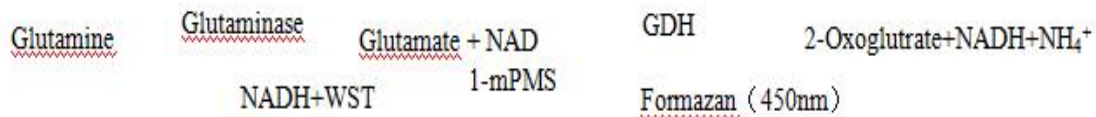
1. 提取液二：氯仿，需自备。
2. 试剂二：试剂质量很小，有可能肉眼观察不到，直接使用即可。临用前取一支加入 0.2mL 蒸馏水，-20°C分装可保存 4 周，避免反复冻融。
3. 试剂二工作液：根据样本量按试剂二：蒸馏水=0.05mL：0.7mL（约 18S）的比例进行稀释，现用现配，使用时置于冰上。
4. 试剂四：临用前加入 20mL 提取液一，用不完的试剂分装后-20°C可保存 4 周。避免反复冻融。
5. 试剂五：临用前加入 1.5mL 试剂一，用不完的试剂分装后-20°C可保存 4 周。避免反复冻融，使用时置于冰上。
6. 标准品：10 $\mu$ mol/mL 谷氨酰胺标准液。

#### 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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -酮戊二酸、NADH 和 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>，在 1-mPMS 作



用下, WST 可与 NADH 反应, 产生水溶性 formazan, 其在 450nm 处有吸收峰, 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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

### 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、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)

1. 组织：按照样本质量(g)：提取液一体积(mL)为 1:5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液一)加入提取液一, 冰浴匀浆; 12000g4°C离心 5min, 取上清加入 500μL 提取液二, 剧烈振荡 5min, 12000g4°C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<sup>4</sup>个)：提取液一体积(mL)为 500~1000:1 的比例(建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液一)加入提取液一, 超声波破碎细菌或细胞(温度 4°C,功率 200W, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3min), 12000g4°C离心 5min, 取上清加入 500μL 提取液二, 剧烈振荡 5min, 12000g4°C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, 12000g4°C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、0.4 $\mu$ mol/mL 标准溶液的稀释：取 40 $\mu$ L 10 $\mu$ mol/mL 谷氨酰胺标准液，加入 960 $\mu$ L 蒸馏水，充分混匀，配制成

0.4 $\mu$ mol/mL 标准溶液使用，现用现配。(实验中每管需要 40 $\mu$ L，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( $\mu$ L)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	40	40	-	-
标准溶液	-	-	40	-
蒸馏水	-	-	-	40
试剂二工作液	40	-	40	40
试剂三	20	60	20	20
37°C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°C避光反应 1h，12000g 常温离心 5min，吸取 200 $\mu$ L 上清，于 450nm 处测定吸光值，分别记为 A 测定、A 对照、A 标准、A 空白。分别计算 $\Delta A$  测定=A 测定-A 对照， $\Delta A$  标准=A 标准-A 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)。A 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)：**

谷氨酰胺含量( $\mu\text{mol}/\text{mgprot}$ )= $\Delta A$  测定 $\times C$  标准 $\div \Delta A$  标准 $\times V$  样总 $\div (Cpr \times V$  样总) $= \Delta A$  测定 $\times 0.4 \div \Delta A$  标准 $\div Cpr$

**(2) 按样本质量计算：**

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

**(3) 按细菌/细胞数量计算：**

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

**(4) 按照液体样本体积计算：**

谷氨酰胺含量( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ) $= \Delta A$  测定 $\times C$  标准 $\div \Delta A$  标准 $= \Delta A$  测定 $\times 0.4 \div \Delta A$  标准  
 $C$  标准：标准溶液浓度， $0.4\mu\text{mol}/\text{mL}$ ； $V$  样总：加入提取液一之后的样本体积， $1\text{mL}$ ； $Cpr$ ：样本蛋白质浓度， $\text{mg}/\text{mL}$ ； $W$ ：样本质量， $\text{g}$ ； $N$ ：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时间，例如  $12000g4^\circ\text{C}$  离心  $5\text{min}$ 。
- 3、 $\Delta A$  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  $0.1011\text{g}$  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 测定=0.37, A 对照=0.1,  $\Delta A$  测定=0.27, A 标准=0.466, A 空白=0.094,  $\Delta A$  标准=0.372。按样本质量计算 Gln 含量得: 谷氨酰胺含量( $\mu\text{mol/g}$  质量)= $\Delta A$  测定 $\times 0.4 \div \Delta A$  标准 $\div W \times 2 = 5.7433 \mu\text{mol/g}$  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 测定=0.349, A 对照=0.147,  $\Delta A$  测定=0.202, A 标准=0.466, A 空白=0.094,  $\Delta A$  标准=0.372。按样本质量计算 Gln 含量得: 谷氨酰胺含量( $\mu\text{mol/g}$  质量)= $\Delta A$  测定 $\times 0.4 \div \Delta A$  标准 $\div W \times 2 = 4.0186 \mu\text{mol/g}$  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 测定=0.155, A 对照=0.118,  $\Delta A$  测定=0.037, A 标准=0.466, A 空白=0.094,  $\Delta A$  标准=0.372。按样本质量计算 Gln 含量得: 谷氨酰胺含量( $\mu\text{mol/mL}$ )= $\Delta A$  测定 $\times 0.4 \div \Delta A$  标准 $\div W \times 2 = 0.0796 \mu\text{mol/mL}$ 。