

## 谷氨酰胺(Gln)含量试剂盒

规格：微量法 48样

检测原理：谷氨酰胺酶法

编号：JLC\_K14913

检测波长：450nm

### 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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -酮戊二酸、NADH和 $\text{NH}_4^+$ ，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×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体500 $\mu$ L×1支，-20℃避光保存。使用时分装冻存，避免反复冻融。

试剂二：液体500 $\mu$ L×1支，4℃保存。

试剂三：粉剂×1瓶，-20℃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×1瓶，-20℃避光保存。分装冻存，避免反复冻融。

试剂五：液体1.5mL×1瓶，-20℃避光保存。

试剂六：液体1.5mL×1瓶，-20℃避光保存。

试剂七：液体12mL×1瓶，4℃保存。

标准品：粉剂×1瓶，4℃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℃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℃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℃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

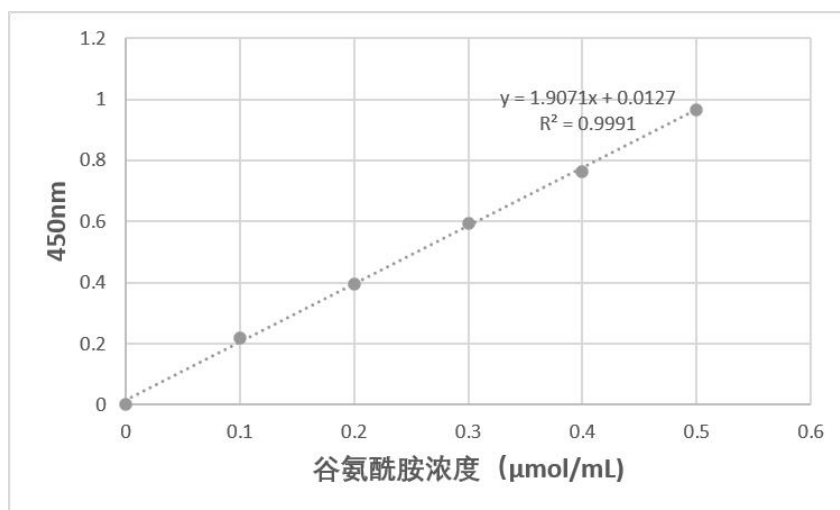
1、分光光度计预热30min以上，调节波长至450nm。

2、在96孔板中依次加入：

| 试剂名称（ $\mu$ L）                                                                                             | 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 ( $\mu\text{mol/mL}$ ),  $y$ 为吸光值 $\Delta A$ 。



#### 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:

$$\text{Gln}(\text{nmol} / \text{mg prot}) = (\Delta A - 0.0127) \div 1.9071 \div \text{Cpr} \times 1000$$

(2) 按样本鲜重计算:

$$\text{Gln}(\text{nmol} / \text{g 鲜重}) = (\Delta A - 0.0127) \div 1.9071 \times V_{\text{样总}} \div W \times 1000$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

$$\text{Gln}(\text{nmol} / 10^4 \text{ cell}) = (\Delta A - 0.0127) \div 1.9071 \times V_{\text{样总}} \div \text{细胞数量} \times 1000$$

$V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1 mL;

$\text{Cpr}$ : 样本蛋白质浓度, mg/mL;

$W$ : 样本质量, g;

细胞数量: 以万计;

1000:  $\mu\text{mol}$ 到 $\text{nmol}$ 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 $10\mu\text{mol/mL}$ 谷氨酰胺。将 $10\mu\text{mol/mL}$ 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,  $0.1\mu\text{mol/mL}$ 。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 ( $\mu\text{L}$ )                                                                                                            | 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, $37^{\circ}\text{C}$ 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, $37^{\circ}\text{C}$ 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 $\Delta A$  ( $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ ) 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适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。