谷氨酰胺(Glutamine，Gln)含量测定试剂盒说明书

（微板法 96 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 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体μL×2 支	-20℃保存	用前甩几下或 4℃离心使液体落入试管底部，每支加入 0.3mL 蒸馏水混匀，可分装后-20℃保存。
试剂二	液体 0.6mL×1 支	4℃保存	
试剂三	液体 14mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉体 mg×1 瓶	-20℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，再加 2.5mL 蒸馏水溶解，仍-20℃保存
试剂五	粉体 mg×2 支	-20℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，每支再加 1.1mL 蒸馏水溶解，可分装后-20℃保存。
试剂六	液体 2.2mL×1 支	4℃保存	
试剂七	液体 22mL×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：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、水浴锅、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，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

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。

【注】：若离心后的上清液（一般高脂或高蛋白的样本如动物组织等）比较浑浊，可取出上清液转移至新 EP 管中再次或多次离心后取上清液测定；也可取上清液于 95℃孵育 5-10min 后离心取上清液测定。

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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃），或可放在 25℃条件下水浴 5-15min。

③ 试剂四和五和六和七可按照 10:10:10:100 比例配成混合液（一枪加 130μL 该混合液）（**该混合液用多少配多少，现配现用**）。

④ 在 96 孔板中依次加入：

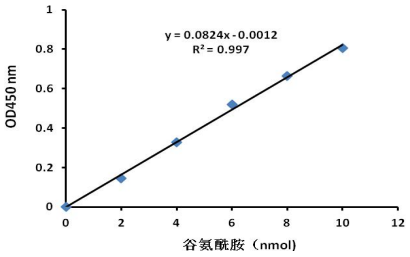
试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	5	
试剂二		5
试剂三	45	45
混匀，37℃，孵育 30min		
试剂四	10	10
试剂五	10	10
试剂六	10	10
试剂七	100	100
混匀，37℃（恒温培养箱）**避光反应 30min**（2min 内值不变，否则需延长反应时间），于 450nm 下读取吸光值 A，ΔA=A 测定-A 对照（每个样本需设置一个对照）。		

【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、△A 低于 0.01，则增加样本加样量 V1（如由 20μL 增至 50μL，则试剂三相应减少），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 = 0.0824x - 0.0012； x 为谷氨酰胺含量（nmol），y 为△A。



2、按照样本质量计算：

谷氨酰胺(Gln)(nmol/g 鲜重)=[(ΔA+0.0012)÷0.0824]÷(W×V1÷V)×D

=606.8×(ΔA+0.0012)÷W×D

谷氨酰胺(Gln)(μg/g 鲜重)=[(ΔA+0.0012)÷0.0824]÷(W×V1÷V)×Mr×10^{-3}×D

=88.68×(ΔA+0.0012)÷W×D

3、按细胞数量计算：

谷氨酰胺(Gln)(nmol/10^4 cell)=[(ΔA+0.0012)÷0.0824]÷(500×V1÷V)×D=1.214×(ΔA+0.0012)×D

谷氨酰胺(Gln)(μg/10^4 cell)=[(ΔA+0.0012)÷0.0824]÷(500×V1÷V)×Mr×10^{-3}×D

=0.18×(ΔA+0.0012)×D

4、按照液体体积计算：

谷氨酰胺(Gln)(nmol/mL)=[(ΔA+0.0012)÷0.0824]÷V1×D=606.8×(ΔA+0.0012)×D

谷氨酰胺(Gln)(μg/mL)=[(ΔA+0.0012)÷0.0824]÷V1×Mr×10^{-3}×D=88.68×(ΔA+0.0012)×D

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入反应体系中样本体积，0.02mL；

谷氨酰胺分子量 Mr---146.146； D---稀释倍数，未稀释即为 1； W---样本质量，g。

附：标准曲线制作过程：

1 制备标准品母液（100nmol/μL）：标准品用 1mL 蒸馏水溶解。（两天内用完且-20℃保存）。

2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. nmol/μL。

3 依据测定管加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。