



## 谷氨酰胺(Gln)活性试剂盒

规格：分光法 24 样

检测波长：450nm

编号：TW57764

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 $\alpha$ -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、可见分光光度计、水浴锅、1mL 玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵和蒸馏水。

### 试剂盒组分与配制

提取液：液体 30 mL×1 瓶，4°C 保存。



试剂一：液体 1mL×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 1mL×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 2mL×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 30mL×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

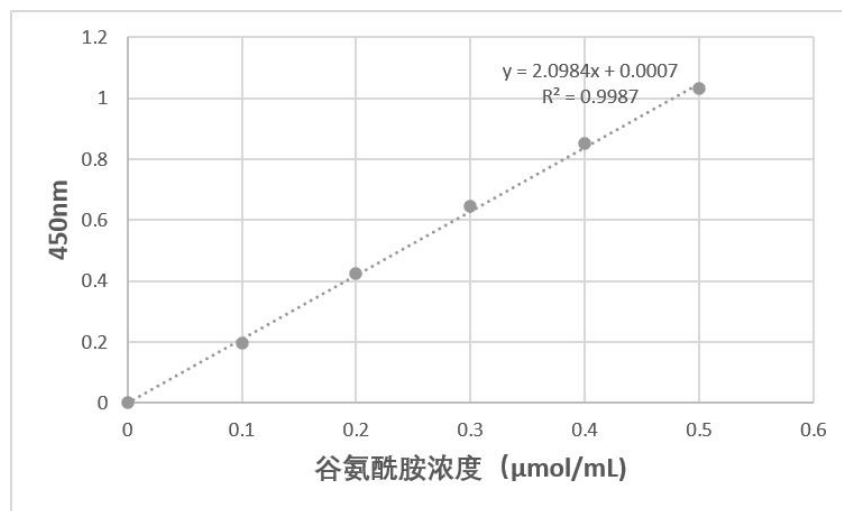
- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm。
- 2、在 1.5mL EP 管中依次加入：



试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	50	50
试剂一	30	-
试剂二	-	30
试剂三	80	80
混匀, 37°C孵育 30min		
试剂四	30	30
试剂五	20	20
试剂六	20	20
试剂七	500	500
混匀, 37°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 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。		

## 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

$$\text{Gln}(\text{nmol} / \text{mL}) = (\Delta A - 0.0007) \div 2.0984 \times 1000$$

### 2、组织、细菌或细胞 Gln 含量



**(1) 按样本蛋白浓度计算：**

$$\text{Gln (nmol /mg prot)} = (\Delta A - 0.0007) \div 2.0984 \div \text{Cpr} \times 1000$$

**(2) 按样本鲜重计算：**

$$\text{Gln (nmol /g 鲜重)} = (\Delta A - 0.0007) \div 2.0984 \times V_{\text{样总}} \div W \times 1000$$

**(3) 按细菌或细胞密度计算**

$$\text{Gln (nmol/ } 10^4 \text{ cell)} = (\Delta A - 0.0007) \div 2.0984 \times V_{\text{样总}} \div \text{细胞数量} \times 1000$$

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	50	-
蒸馏水	-	50
试剂一	30	30
试剂三	80	80



混匀，37°C 孵育 30min		
试剂四	30	30
试剂五	20	20
试剂六	20	20
试剂七	500	500

混匀，37°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最佳适应稀释浓度范围，指导实验样本稀释比例。