

谷氨酰胺 (Gln) 含量检测试剂盒 (可见分光光度法)

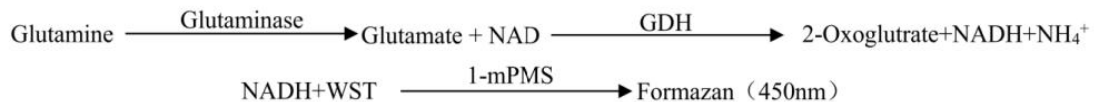
产品货号: BA2138

产品规格: 50T/24S

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 α -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 α -酮戊二酸、NADH和 NH_4^+ , 在1-mPMS作用下, WST可与NADH反应, 产生水溶性formazan, 其在450nm处有最大吸收峰, 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。

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体70mL×1瓶	2-8°C
提取液二	自备试剂	-
试剂一	液体3mL×1瓶	2-8°C
试剂二	粉剂×2瓶	-20°C
试剂三	液体10mL×1瓶	2-8°C
试剂四	粉剂×1瓶	-20°C
试剂五	粉剂×1瓶	-20°C
试剂六	液体8mL×1瓶	2-8°C
标准品	液体1mL×1支	2-8°C

溶液的配制:

1. 提取液二: 自备氯仿, 大约需要15mL, 常温保存; 试剂盒内提供一个30mL棕色空瓶, 仅做分装使用, 请自行标注试剂名称。
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(该试剂为冻干试剂, 可能存在不同瓶间肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象, 此现象不影响使用, 实际质量相同)。
3. 试剂二工作液: 提供一空棕色试剂瓶。根据样本量按试剂二:蒸馏水=0.2mL:2.8mL(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40mL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2.5mL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 μ mol/mL谷氨酰胺标准液。

需自备的仪器和用品:

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(>98%, AR)、1mL 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, 具体比例可以参考文献)

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; 12000g 4°C 离心 5min, 取上清加入 500 μ L 提取液二, 剧烈振荡 5min, 12000g 4°C



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

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(10^4 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), $12000\text{g } 4^{\circ}\text{C}$ 离心 5min, 取上清加入 $500\mu\text{L}$ 提取液二, 剧烈振荡 5min, $12000\text{g } 4^{\circ}\text{C}$ 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 $500\mu\text{L}$ 样本加入 $500\mu\text{L}$ 提取液二(若溶液浑浊则需先离心后取上清), 剧烈振荡 5min, $12000\text{g } 4^{\circ}\text{C}$ 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. 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 450nm , 用蒸馏水调零。
2. $0.4\mu\text{mol/mL}$ 标准溶液的稀释: 取 $40\mu\text{L}$ $10\mu\text{mol/mL}$ 谷氨酰胺标准液, 加入 $960\mu\text{L}$ 蒸馏水, 充分混匀, 配制成 $0.4\mu\text{mol/mL}$ 标准溶液使用, 现用现配。(实验中每管需要 $160\mu\text{L}$, 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 (μL)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	160	160	-	-
标准液	-	-	160	-
蒸馏水	-	-	-	160
试剂二工作液	160	-	160	160
试剂三	80	240	80	80
37 $^{\circ}\text{C}$ 酶促反应 1h				
试剂四	640	640	640	640
试剂五	40	40	40	40
试剂六	120	120	120	120

37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 1h, 12000g 常温离心 5min, 吸取 1mL 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 ΔA 测定 = A 测定 - A 对照, ΔA 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)。 ΔA 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):

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

2. 按照样本质量计算:

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

3. 按细菌/细胞数量计算:

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

4. 按照液体样本体积计算:

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

C: 标准溶液浓度, $0.4\mu\text{mol/mL}$; V 样总: 加入提取液一之后的样本体积, 1mL; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, 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 $12000\text{g } 4^{\circ}\text{C}$ 离心 5min。
3. ΔA 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com