

谷氨酰胺(Glutamine, Gln)含量测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

谷氨酰胺（Glutamine）是构成人体蛋白质所必需的 20 种氨基酸之一。是人体内最普遍的、不可缺乏的条件性必需氨基酸，是构成蛋白质不可缺少的氨基酸之一，更是某些细胞培养中最基本的元素。由于谷氨酰胺不稳定的特性，在细胞培养基的整合中，易自发性分解为谷氨酸和氨离子，而氨离子对细胞的毒性很强，因此，在细胞培养体系中，须密切关注谷氨酰胺的储存寿命（SHELF LIFE）和实时监测。

测定原理：

在谷氨酰胺酶（Glutaminase）作用下，谷氨酰胺发生脱氨基反应，产生谷氨酸（glutamic acid）和氨离子；

谷氨酰胺酶：

谷氨酰胺+H₂O—————谷氨酸+NH₄⁺然后用显色剂进行显色，显色后在 570nm 下进行测定。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、研钵、冰、蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：液体 50mL×2 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 1.5mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂三，粉剂×1 瓶， 4℃保存；临用前加入 10mL 蒸馏水，充分混匀溶解，用不完的试剂仍 4℃保存

谷氨酰胺提取：

1、细菌或培养细胞样品：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（10⁴ 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 1000 万细菌或细胞加入 2mL 试剂一），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）；8000g 常温离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、组织样品：按照组织质量（g）：试剂一体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.2g 组织，加入 2mL 试剂一），进行冰浴匀浆。8000g 常温离心 10min，取上清，置冰上待测。

3、血清（浆）或细胞培养液样品：按照血清（浆）或细胞培养液体积（mL）：试剂一体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议取 0.2mL 血清（浆）或者细胞培养液加入 2mL 试剂一），进行冰浴匀浆。8000g 常温离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤:

试剂名称 (μL)	测定管	对照管 1	对照管 2
样本	1000	1000	
试剂一		50	1000
试剂二	10	10ul 蒸馏水	10

混匀, 37℃水浴 30min (盖紧, 以防止水分散失)

试剂名称 (μL)	测定管	对照管 1	对照管 2
试剂三	200	200	200

90℃水浴 20min (盖紧, 以防止水分散失), 流水冷却, 于 570nm 波长处比色,

$\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管 1}} - A_{\text{对照管 2}}$ 。对照管 2 只要做一管。

谷氨酰胺含量计算:

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 0.0074x - 0.5255$; x 为谷氨酰胺含量 (μg/mL), y 为吸光值。

2、按照血清 (浆) 或者细胞培养液体积计算

谷氨酰胺含量 (μg/mL) = $[(\Delta A + 0.5255) \div 0.0074 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 1351 \times (\Delta A + 0.5255)$

3、按照蛋白浓度计算

谷氨酰胺含量 (μg/mg prot) = $[(\Delta A + 0.5255) \div 0.0074 \times V1] \div (V1 \times Cpr) = 135.1 \times (\Delta A + 0.5255) \div Cpr$

4、按照样本质量计算

谷氨酰胺含量 (μg/g 鲜重) = $[(\Delta A + 0.5255) \div 0.0074 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 270.2 \times (\Delta A + 0.5255) \div W$

5、按照细菌或细胞密度计算

谷氨酰胺含量 (μg/104 cell) = $[(\Delta A + 0.5255) \div 0.0074 \times V1] \div (1000 \times V1 \div V2) = 0.27 \times (\Delta A + 0.5255)$

V1: 加入反应体系中样本体积, 1mL; V2: 加入提取液体积, 2 mL; V3: 加入血清 (浆) 或细胞培养液体积, 0.2 mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 1000: 细菌或细胞总数, 1000 万。

注意:

- 该试剂盒仅适用于发酵液或组织中谷氨酰胺含量测定, 检测下限为 100μg/mL。
- 标准曲线线性范围为: 100μg/mL - 600μg/mL。
- A 线性范围为: 0.01-2; 若大于 2 则需要将上清液用试剂一稀释至适当倍数后测定, 计算公式中乘以相应稀释倍数。