

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ254

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(440-460 nm)

Elabscience®谷氨酰胺(Gln)比色法测试盒

Glutamine (Gln) Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、培养基、动植物组织及细胞样本中谷氨酰胺(Gln)的含量。

检测原理

谷氨酰胺(Gln)是生物体内最丰富的氨基酸之一，含有一个不带电的酰胺作为侧链，是一种非必需氨基酸，是由谷氨酸和氨缩合而成，但在蛋白质合成、哺乳动物肾脏酸平衡调节和细胞生长等生物学过程中具有重要作用。它是细胞合成核苷酸和己糖胺所需的氮的主要来源。

Gln 在酶的催化作用下反应，同时 NAD^+ 被还原成 NADH，NADH 在递氢物质的作用下将 WST-8 还原生成橙黄色的甲瓚，在 450 nm 左右有最大吸收峰。通过 450 nm 下测定吸光值变化可测得体系中 Gln 含量。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48T)	规格 2 (Size 2)(96T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	酶试剂 A (Enzyme Reagent A)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	酶试剂 B (Enzyme Reagent B)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶稀释液 (Enzyme Diluent)	12 mL×1 瓶	24 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	促进剂 (Accelerator)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	底物 (Substrate)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	显色剂 (Chromogenic Agent)	1.5 mL×1 支	1.5 mL×2 支	-20℃避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	标准品 (Standard)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃避光 保存 6 个月
试剂八 (Reagent 8)	缓冲液 (Buffer Solution)	3 mL×1 瓶	6 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求

	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(440-460 nm，最佳检测波长 450 nm)，恒温箱(37℃)

仪器：生理盐水(0.9% NaCl)

耗材：50 KD 超滤管

试剂准备

① 检测前，试剂平衡至室温。

② 试剂一工作液配制：

取一支试剂一加入200 μ L试剂八充分溶解，置于冰盒上待用，未用完部分-20℃可避光保存3天。按溶解后的试剂一：试剂八=1: 9的体积比配制试剂一工作液，按需配制，现配现用，配好的工作液在4 h内使用完。

③ 试剂二工作液配制：

每支试剂二加入200 μ L双蒸水充分溶解，置于冰盒上待用，未用完部分-20℃可避光保存3天。

④ 试剂四工作液配制：

取一支试剂四加入1 mL双蒸水溶解备用，未用完部分-20℃可避光保存3天。

⑤ 试剂五工作液配制：

取一支试剂五加0.5 mL双蒸水溶解备用，溶解后的试剂五-20℃可避光保存3天。按溶解后的试剂五：试剂三：试剂四工作液=1: 18: 1的体积比配制试剂五工作液，按需配制，现配现用，配好的工作液在12 h内使用完。

⑥ 反应工作液配制:

按试剂二工作液:试剂五工作液:试剂六=8:1192:200的体积比进行配制,置于冰盒上待用,现配现用,避光保存,配好的反应工作液在1 h内使用(建议在酶促反应期间进行配制)。

⑦ 100 mmol/L标准品溶液的配制:

每支试剂七加入1 mL生理盐水(0.9%NaCl)充分溶解备用,未用完部分-20℃避光可保存3天。

⑧ 2 mmol/L标准品溶液配制:

按100 mmol/L标准品溶液:生理盐水(0.9%NaCl)=1:49的体积比进行配制,配好的标准品溶液1天内使用有效。

⑨ 不同浓度标准品的稀释:

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	0	0.4	0.6	0.8	1.2	1.6	1.8	2.0
2 mmol/L 标准品(μL)	0	40	60	80	120	160	180	200
生理盐水(μL)	200	160	140	120	80	40	20	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)等液体样本：使用 50 KD 超滤管离心过滤，收集滤液待测。

组织样本：取 0.1 g 新鲜组织样本，加入 0.9 mL 生理盐水(0.9% NaCl)匀浆，4℃，10000 × g 离心 15 min，取上清用 50 KD 超滤管离心过滤，收集滤液待测。

细胞样本：取 1×10⁶ 个以上细胞，加入 0.2mL 生理盐水（0.9% NaCl）匀浆，4℃，10000 × g 离心 15 min，取上清用 50 KD 超滤管离心过滤，收集滤液待测。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.036-2.0 mmol/L，可参考下表进行稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠肝组织	不稀释	10%小鼠肺组织	不稀释
10%大鼠脑组织	不稀释	10%小鼠肝组织	不稀释
10%大鼠脾组织	3-5	10%绿萝叶片组织	3-5
1×10 ⁶ 个 THP-1 细胞	不稀释	2×10 ⁶ 个 Molt-4 细胞	不稀释
大鼠血浆	不稀释	小鼠血清	不稀释
小鼠血浆	不稀释	人血清	2-3

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

实验关键点

- ① 加入反应工作液时注意小心吸打，避免酶标孔内有气泡。
- ② 反应过程全程避光。
- ③ 试剂一工作液触底加入。

操作步骤

- ① 标准孔：向标准孔中加入 30 μL 试剂一工作液。
测定孔：向测定孔中加入 30 μL 试剂一工作液。
- ② 向步骤①中各标准孔加入 50 μL 不同浓度的标准品溶液，测定孔加入 50 μL 待测样本。
- ③ 振板 3 s，37°C下避光孵育反应 20 min。
- ④ 向步骤③中各孔加入 140 μL 反应工作液。
- ⑤ 振板 3 s，酶标仪 450 nm 下测得各孔 OD 值 A₁。
- ⑥ 37°C下避光孵育反应 30 min。
- ⑦ 酶标仪于 450 nm 波长测定各孔 OD 值 A₂，计算变化 OD 值 $\Delta A(\Delta A = A_2 - A_1)$ 。

操作表

	标准孔	测定孔
试剂一工作液(μL)	30	30
不同浓度的标准品溶液(μL)	50	--
待测样本(μL)	--	50
振板 3 s，37°C下避光孵育反应 20 min。		
反应工作液(μL)	140	140
振板 3 s，酶标仪 450 nm 下测得各孔 OD 值 A ₁		
37°C下避光孵育反应 30 min		
酶标仪于 450 nm 波长测定各孔 OD 值 A ₂ ，计算变化 OD 值 $\Delta A(\Delta A = A_2 - A_1)$ 。		

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

血清(浆)和培养基样本中 Gln 计算公式：

$$\frac{\text{Gln 含量}}{(\text{mmol/L})} = (\Delta A_{450} - b) \div a \times f$$

组织样本中 Gln 计算公式：

$$\frac{\text{Gln 含量}}{(\text{mmol/kg wet weight})} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div \frac{m}{V} \times f$$

细胞样本中 Gln 计算公式：

$$\frac{\text{Gln 含量}}{(\mu\text{mol}/10^6)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div \frac{n}{V} \times f$$

注解：

y: $\Delta A_{\text{标}} - \Delta A_{\text{空}}$ (标准品浓度为 0 时 OD 变化值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA_{450} : $\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}$ (标准品浓度为 0 时 OD 变化值)

m: 组织湿重质量，g

n: 细胞个数， 10^6

V: 样本匀浆液体积，mL

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

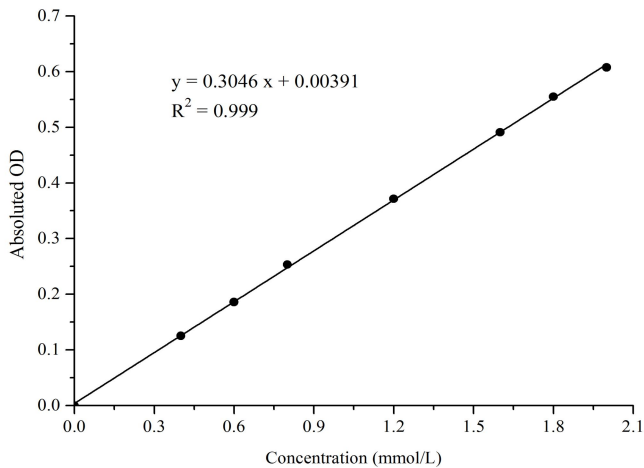
检测范围	0.036-2.0 mmol/L	平均批间差	4.7 %
灵敏度	0.036 mmol/L	平均批内差	3.2 %
平均回收率	97 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量 50 μL，按照操作步骤进行实验，各点OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	0	0.4	0.6	0.8	1.2	1.6	1.8	2.0
A ₁	0.061	0.066	0.071	0.074	0.082	0.089	0.089	0.091
	0.056	0.066	0.070	0.073	0.081	0.086	0.090	0.090
A ₂	0.077	0.209	0.273	0.344	0.474	0.600	0.654	0.718
	0.074	0.208	0.274	0.344	0.466	0.591	0.669	0.712
ΔA 值	0.016	0.143	0.202	0.271	0.392	0.511	0.565	0.627
	0.018	0.142	0.204	0.271	0.385	0.505	0.579	0.622
平均ΔA 值	0.017	0.143	0.203	0.271	0.389	0.508	0.572	0.625
绝对ΔA 值	0	0.126	0.186	0.254	0.371	0.491	0.555	0.608

②绘制标曲（如下图）：



附录2 实例分析

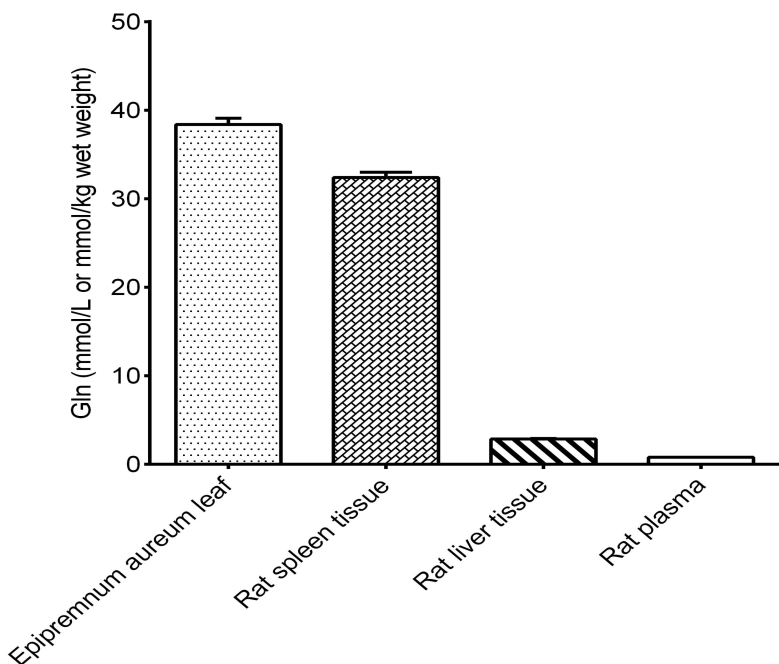
例如测定10%大鼠肝脏组织(数据仅供参考):

取10%大鼠肝脏组织匀浆上清液50 μL , 按操作表操作, 结果如下:

标准曲线: $y = 0.2774x + 0.0046$, 空白孔变化OD值 $\Delta A_{\text{空}}$ 为0.027, 测定孔变化OD值 $\Delta A_{\text{样}}$ 为0.11, 组织湿重质量为0.1 g, 计算结果为:

$$\text{Gln 含量 (mmol/kg wet weight)} = (0.11 - 0.027 - 0.0046) \div 0.2774 \div \frac{0.1}{0.9} = 2.54 \text{ mmol/kg weight wet}$$

按说明书操作, 测定10%绿萝叶片匀浆(稀释3倍, 加样量50 μL)、10%大鼠脾组织匀浆(稀释3倍, 加样量50 μL)、10%大鼠肝组织匀浆(加样量50 μL)和大鼠血浆(加样量50 μL)的Gln含量(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测不出值	反应工作液未避光。	重新配制工作液，反应工作液存放须避光。
	样本稀释倍数大或样本中待测物质含量低。	组织样本可以提高组织匀浆浓度，使用高浓度样本检测。
空白孔初始 OD 值 $A_1 > 0.2$	反应工作液放置时间太久，酶失活。	反应工作液现配现用。

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Tseng S.Ja. An acid degradable, lactate oxidizing nanoparticle formulation for non-small cell lung cancer virotherapy[J]. Nano Today. IF:18.962
2. Salman T M, Iyanda M A, Alli-Oluwafuyi A M, et al. Telfairia occidentalis stimulates hepatic glycolysis and pyruvate production via insulin-dependent and insulin-independent mechanisms[J]. Metabolism Open, 2021, 10(1-10):100092. IF:8.694
3. Zhang Y, Wang Z, Shi B, et al. Effect of gingival mesenchymal stem cell-derived exosomes on inflammatory macrophages in a high-lipid microenvironment[J]. International Immunopharmacology, 2021, 94(9499):107455. IF:4.932
4. Alsayyah A, ElMazoudy R, Al-Namshan M, et al. Chronic neurodegeneration by aflatoxin B1 depends on alterations of brain enzyme activity and immunoexpression of astrocyte in male rats[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2019, 182: 109407. IF:4.527
5. Faheem M. Synthesis and Biological Evaluation of Benzimidazole Derivatives as Potential Neuroprotective Agents in an Ethanol-Induced Rodent Model[J]. ACS Chemical Neuroscience, 2021, 12(3):489–505. IF:4.418
6. Ren F , Xu X , Xu J B , et al. Compound essential oils relieve oxidative stress caused by PM 2. 5 exposure by inhibiting autophagy through the AMPK / mTOR pathway[J]. Environmental Toxicology, 2021 Sep; 36(9):1765-1774. IF:4.119
7. Mohsin Alvi A, Tariq Al Kury L, Umar Ijaz M, et al. Post-Treatment of Synthetic Polyphenolic 1, 3, 4 Oxadiazole Compound A3, Attenuated Ischemic Stroke-Induced Neuroinflammation and Neurodegeneration[J]. Biomolecules, 2020, 10(6): 816. IF:4.082
8. Darband S G, Sadighparvar S, Yousefi B, et al. Quercetin attenuated oxidative DNA damage through NRF2 signaling pathway in rats with DMH induced colon carcinogenesis[J]. Life sciences, 2020(253-). IF:3.708
9. Shah F A, Ali T, Khan A U. Potent Natural Antioxidant Carveol Attenuates MCAO-induced Oxidative stress, Neurodegeneration by Regulating the Nrf-2 pathway[J]. Frontiers in Neuroscience, 2020, 14: 659. IF:3.707
10. Amany Abdel-Rahman Mohamed , Safaa I. Khater , Ahmed Hamed Arisha , et al. Chitosan-stabilized selenium nanoparticles alleviate cardio-hepatic damage in type 2 diabetes mellitus model via regulation of caspase, Bax/Bcl-2, and Fas/FasL-pathway[J]. Gene, 2020, 768(7):145288. IF:3.688
11. Amany Abdel-Rahman Mohamed , Safaa I. Khater , Ahmed Hamed Arisha , et al. Chitosan-stabilized selenium nanoparticles alleviate cardio-hepatic damage in type 2

diabetes mellitus model via regulation of caspase, Bax/Bcl-2, and Fas/FasL-pathway[J]. *Gene*, 2020, 768(7):145288. IF:3.688

12. Yu H, Zhang L, Chen P, et al. Dietary bile acids enhance growth, and alleviate hepatic fibrosis induced by a high starch diet via AKT/FOXO1 and cAMP/AMPK/SREBP1 pathway in *Micropterus salmoides*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10. IF:3.367
13. Li J, Ma X J, Wu X, et al. Adiponectin modulates steroid hormone secretion, granulosa cell proliferation and apoptosis via binding its receptors during hens' high laying period[J]. *Poultry Science*, 2021, 100(7): 101197. IF:3.352
14. Fu H, Liu L, Tong Y, et al. The antidepressant effects of hesperidin on chronic unpredictable mild stress-induced mice[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2019. IF:3.04
15. Guo Y, Liu C, Zhang J, et al. A relationship between MAPK/ERK pathway expression and neuronal apoptosis in rats with white matter lesions[J]. *European review for medical and pharmacological sciences*, 2020, 24(8): 4412-4419. IF:3.024
16. Li L C , Dong S H , Li S H , et al. Downregulation of circular RNA circDOCK7 identified from diabetic rats after sleeve gastrectomy contributes to hepatocyte apoptosis through regulating miR-139-3p and MCM3[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 548:134-142. IF:2.985
17. Kumar S, Ivanov S, Lagunin A, et al. Attenuation of Hyperhomocysteinemia Induced Vascular Dementia by Sodium Orthovanadate Perhaps via PTP1B: Pertinent Downstream Outcomes[J]. *Behavioural Brain Research*, 2019. IF:2.77
18. Yin X, Zhao J, Jiang H, et al. Impact of Xenon on CLIC4 and Bcl-2 Expression in Lipopolysaccharide and Hypoxia-Ischemia-Induced Periventricular White Matter Damage[J]. *Neonatology*, 2018. IF:2.554
19. Pan H Z, Zhang L J, Liu Y W, et al. Cold-inducible RNA binding protein agonist enhances the cardioprotective effect of UW solution during extended heart preservation[J]. *Artificial Organs*, 2020. IF:2.259
20. Uysal N, Yuksel O, Kizildag S, et al. Regular Aerobic Exercise Correlates with Reduced Anxiety and Increased Levels of Irisin in Brain and White Adipose Tissue[J]. *Neuroscience Letters*, 2018. IF:2.173
21. Jasiński Tomasz , Bręborowicz Andrzej . Hyaluronan reduces colitis-induced intraperitoneal inflammation during peritoneal dialysis[J]. *Peritoneal Dialysis International*, 2021. IF:1.756