

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K853-M

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](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址: [www.elabscience.cn](http://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  $\text{NAD}^+$  被还原成  $\text{NADH}$ ， $\text{NADH}$  在递氢物质的作用下将 WST-8 还原生成橙黄色的甲瓩，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<br>(Size 1)(48T) | 规格 2<br>(Size 2)(96T) | 保存方式<br>(Storage)  |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| 试剂一<br>(Reagent 1) | 酶试剂 A<br>(Enzyme Reagent A) | 粉剂×1 支                | 粉剂×2 支                | -20℃ 避光<br>保存 6 个月 |
| 试剂二<br>(Reagent 2) | 酶试剂 B<br>(Enzyme Reagent B) | 粉剂×1 支                | 粉剂×2 支                | -20℃ 避光<br>保存 6 个月 |
| 试剂三<br>(Reagent 3) | 酶稀释液<br>(Enzyme Diluent)    | 12 mL×1 瓶             | 24 mL×1 瓶             | -20℃<br>保存 6 个月    |
| 试剂四<br>(Reagent 4) | 促进剂<br>(Accelerator)        | 粉剂×1 支                | 粉剂×2 支                | -20℃ 避光<br>保存 6 个月 |
| 试剂五<br>(Reagent 5) | 底物<br>(Substrate)           | 粉剂×1 支                | 粉剂×2 支                | -20℃ 避光<br>保存 6 个月 |
| 试剂六<br>(Reagent 6) | 显色剂<br>(Chromogenic Agent)  | 1.5 mL×1 支            | 1.5 mL×2 支            | -20℃ 避光<br>保存 6 个月 |
| 试剂七<br>(Reagent 7) | 标准品<br>(Standard)           | 粉剂×1 支                | 粉剂×2 支                | -20℃ 避光<br>保存 6 个月 |
| 试剂八<br>(Reagent 8) | 缓冲液<br>(Buffer Solution)    | 3 mL×1 瓶              | 6 mL×1 瓶              | -20℃<br>保存 6 个月    |
|                    | 96 孔酶标板                     | 1 板                   |                       |                    |

|  |         |     |  |
|--|---------|-----|--|
|  | 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°C)

**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  $\mu$ L试剂八充分溶解，置于冰盒上待用，未用完部分-20°C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  $\mu$ L双蒸水充分溶解，置于冰盒上待用，未用完部分-20°C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°C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°C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°C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( $\mu$ L) | 0   | 40  | 60  | 80  | 120 | 160 | 180 | 200 |
| 生理盐水( $\mu$ L)         | 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°C，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  $1 \times 10^6$  个以上细胞，加入 0.2mL 生理盐水（0.9% NaCl）匀浆，4°C，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  |
| $1 \times 10^6$ 个 THP-1 细胞 | 不稀释  | $2 \times 10^6$ 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  $\mu\text{L}$  试剂一工作液。  
测定孔：向测定孔中加入 30  $\mu\text{L}$  试剂一工作液。
- ② 向步骤①中各标准孔加入 50  $\mu\text{L}$  不同浓度的标准品溶液，测定孔加入 50  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  反应工作液。
- ⑤ 振板 3 s, 酶标仪 450 nm 下测得各孔 OD 值  $A_1$ 。
- 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  $A_2$ , 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( $\mu\text{L}$ )   | 30  | 30  |
| 不同浓度的标准品溶液( $\mu\text{L}$ )   | 50  | --  |
| 待测样本( $\mu\text{L}$ )   | --  | 50  |
| 振板 3 s, 37°C 下避光孵育反应 20 min。  |     |     |
| 反应工作液( $\mu\text{L}$ )  | 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:

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

组织样本中 Gln 计算公式:

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

细胞样本中 Gln 计算公式:

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

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

$\Delta A_{450}$ :  $\Delta A_{\text{测}} - \Delta A_{\text{空}}$  (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

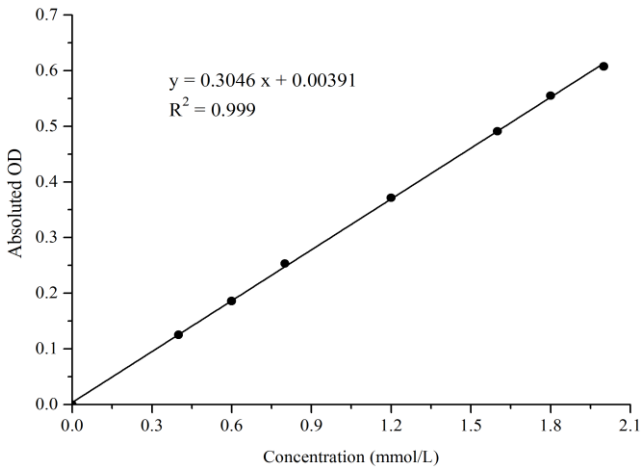
|       |                  |       |       |
|-------|------------------|-------|-------|
| 检测范围  | 0.036-2.0 mmol/L | 平均批间差 | 4.7 % |
| 灵敏度   | 0.036 mmol/L     | 平均批内差 | 3.2 % |
| 平均回收率 | 97 %             |       |       |

## 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<br>(mmol/L) | 0     | 0.4   | 0.6   | 0.8   | 1.2   | 1.6   | 1.8   | 2.0   |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A <sub>1</sub>    | 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 <sub>2</sub>    | 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

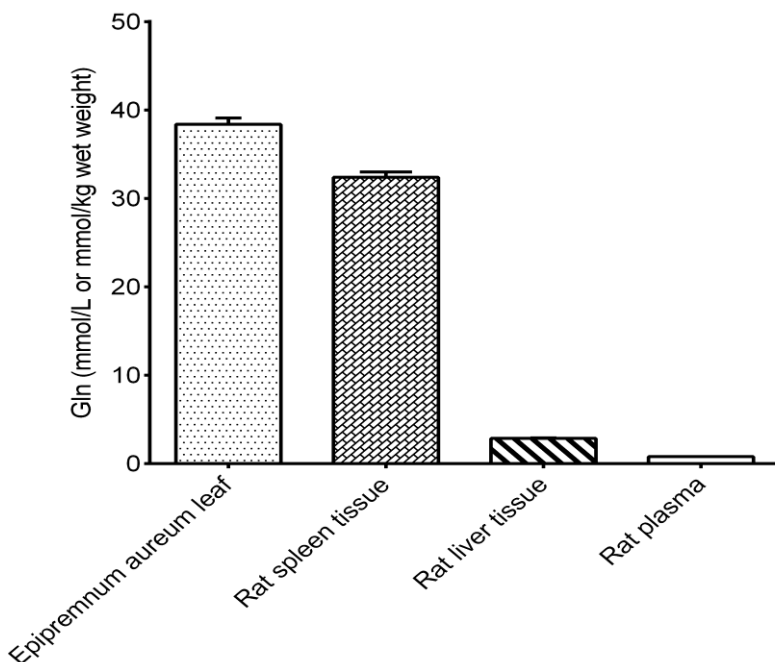
例如测定10%大鼠肝脏组织(数据仅供参考):

取10%大鼠肝脏组织匀浆上清液50  $\mu\text{L}$ , 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  $\mu\text{L}$ )、10%大鼠脾组织匀浆(稀释3倍, 加样量50  $\mu\text{L}$ )、10%大鼠肝组织匀浆(加样量50  $\mu\text{L}$ )和大鼠血浆(加样量50  $\mu\text{L}$ )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