



DATA SHEET

Product name: L-Glutamine Assay Kit

Cat. No: YMS-80116

Features of the kit

This product is an L-glutamine measurement kit using L-glutamate oxidase^{†1}. Even in samples containing both L-glutamic acid and L-glutamine, only L-glutamine can be specifically quantified (see the principle of measurement). In addition, L-glutamine can be quantified by a simpler method than that using L-glutamate dehydrogenase (see the measuring method). All necessary reagents are included with ready-to-use R1 and 2 enzyme reagents (see the product contents).

The product that allows simple measurement of glutamine is useful in controlling L-glutamine concentrations in media to produce antibodies and recombinant proteins from cultured cells, and quantifying L-glutamine in various foods. In addition, it can also be applied to the quantification of L-glutamine in various samples in amino acid metabolism research in the fields of biochemistry and medicine.

Principle of measurement

After the addition of the R1 enzyme reagent, L-glutamic acid in a sample is oxidized by L-glutamate oxidase, generating hydrogen peroxide. Since the hydrogen peroxide is decomposed by catalase, L-glutamic acid preliminarily contained in the sample is removed. Subsequently, after the addition of the R2 enzyme reagent, L-glutamine in the sample is decomposed to L-glutamic acid by glutaminase. The L-glutamic acid is oxidized by L-glutamate oxidase, generating hydrogen peroxide.

The generated hydrogen peroxide exhibits a purple color produced by the reaction of a chromogenic substrate and peroxidase. The L-glutamine concentration in a sample is determined using the absorbance (555 nm) of the purple color. Immediately after the addition of the R2 enzyme reagent, the catalase is immediately deactivated by sodium azide.

Inhibiting the effects of L-ascorbic acid (vitamin C)

In this product, a color reaction is inhibited by L-ascorbic acid in a sample if it is present above a certain level. For example, if the concentration of L-ascorbic acid is 25 mg/mL in 250 mg/L L-glutamine, the absorbance is reduced by about 10%, compared to its absence. Therefore, for the measurement of L-glutamine in such samples, appropriate pretreatment is needed. As a method to prevent the inhibitory effects of L-ascorbic acid on coloring, enzymatic treatment with ascorbate oxidase is employed (see the example below).

Ascorbate oxidase is not included in the product, and is unavailable from our company.

Please purchase a commercially available product.

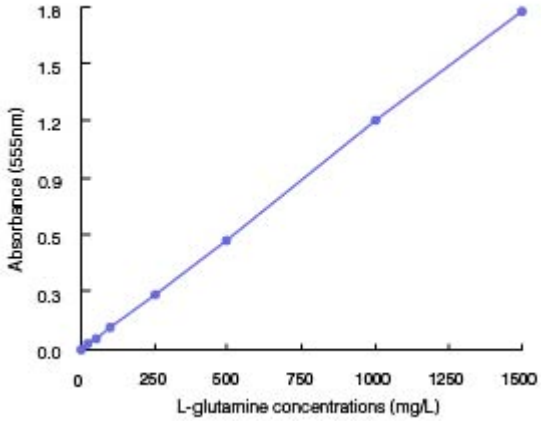
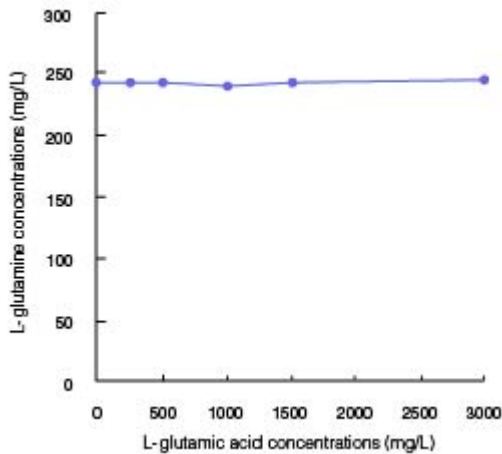
Measuring method

Dissolve a glutamic acid standard solution (hereinafter, standard solution) in 0.5 mL of purified water. Prepare a control to examine the effects on measurement according to sample conditions.

1. Dispense 10 μL each of sample, standard solution, and purified water into each test tube.
2. Dispense 450 μL of the R1 enzyme reagent into each tube, followed by mixing.
3. Allow the tube to stand for 20 minutes at 20-30°C.
4. Dispense 450 μL of the R2 reagent into each tube, followed by mixing.
5. Allow the tube to stand at 20-30°C for 20 minutes. Measure absorbance at 555 nm using purified water as a control.
6. Calculate L-glutamine content in the sample according to the following formula using the absorbance of sample (A), standard solution (S), and purified water (R).

$$\text{L-glutamine (mg/L)} = (A-R) \div (S-R) * 250 * \text{dilution rate (for a diluted sample)}$$

Example of use

Example of a calibration curve for L-glutamine	Effects of L-glutamic acid in samples																								
L-glutamine can be measured in the range of 10-1,500 mg/L.	In samples containing about 250 mg/L L-glutamine, L-glutamic acid has no effects on measurement even if at concentrations of 3,000 mg/L.																								
 <table border="1" data-bbox="156 1317 699 1736"> <caption>Calibration Curve Data</caption> <thead> <tr> <th>L-glutamine concentrations (mg/L)</th> <th>Absorbance (555nm)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>0.0</td></tr> <tr><td>250</td><td>0.3</td></tr> <tr><td>500</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>1000</td><td>1.2</td></tr> <tr><td>1500</td><td>1.8</td></tr> </tbody> </table>	L-glutamine concentrations (mg/L)	Absorbance (555nm)	0	0.0	250	0.3	500	0.5	1000	1.2	1500	1.8	 <table border="1" data-bbox="821 1317 1324 1769"> <caption>Effect of L-glutamic acid on L-glutamine measurement</caption> <thead> <tr> <th>L-glutamic acid concentrations (mg/L)</th> <th>L-glutamine concentrations (mg/L)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>245</td></tr> <tr><td>500</td><td>245</td></tr> <tr><td>1000</td><td>245</td></tr> <tr><td>1500</td><td>245</td></tr> <tr><td>3000</td><td>245</td></tr> </tbody> </table>	L-glutamic acid concentrations (mg/L)	L-glutamine concentrations (mg/L)	0	245	500	245	1000	245	1500	245	3000	245
L-glutamine concentrations (mg/L)	Absorbance (555nm)																								
0	0.0																								
250	0.3																								
500	0.5																								
1000	1.2																								
1500	1.8																								
L-glutamic acid concentrations (mg/L)	L-glutamine concentrations (mg/L)																								
0	245																								
500	245																								
1000	245																								
1500	245																								
3000	245																								

Products contents

Code	80116
Product name	L-glutamine assay kit
Components	R1 enzyme reagent 30ml 1 bottle R2 enzyme reagent 30ml 1 bottle Glutamine standard (250 mg/L, Lyophilized) *A total of 66 measurements can be conducted according to the attached document (including a standard solution, blank, and control).
Storage	Store in the dark at 2-8°C
Shelf life	24 months after manufacture

Example of pretreatment with ascorbate oxidase

An example of pretreatment using a 250 mg/mL L-glutamine solution is shown below. The concentration of ascorbate oxidase is adjusted to 5 U/mL in PBS.

1. Add 10 µL of ascorbate oxidase solution to 10 µL of sample.
2. Allow the sample to stand at room temperature for 10 minutes.
3. Measure the treated solution as a sample (the original sample is diluted twofold).

After this treatment, there is no effect on L-glutamine measurement even if at 1,000 mg/L of L-ascorbic acid. However, during sample pretreatment, a sample containing an appropriate amount of L-glutamine should be simultaneously measured to check the recovery rate.

References

- *1 Arima J et al., J Biochem 134, 805-812, 2003 PMID: 14769868



COSMO BIO Co., LTD.

TOYO EKIMAE BLDG. 2-20, TOYO 2-CHOME,
KOTO-KU. TOKYO 135-0016, JAPAN
TEL : (81)3-5632-9617
FAX : (81)3-5632-9618
e-mail : export@cosmobio.co.jp
URL : www.cosmobio.com



www.cosmobio.com

L-グルタミンアッセイキット

本品は、体外診断用医薬品ではありません。

【キットの特徴】

本品は、L-グルタミン酸オキシダーゼ(参考文献1)を用いたL-グルタミンの測定キットです。試料中にL-グルタミン酸とL-グルタミンが共存していても、L-グルタミンのみを特異的に定量することが可能です。また、L-グルタミン酸脱水素酵素を用いる方法に比べ、簡単な操作でL-グルタミンを定量できます。

培養細胞を用いた抗体や組換えタンパク質の生産工程における培地中のL-グルタミンの濃度管理、各種食品におけるL-グルタミンの定量分析などに有用です。

また、生化学・医学分野の様々なアミノ酸代謝研究における各種試料中のL-グルタミン定量にも応用することができます。

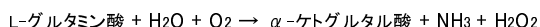
【キットの構成】

- ① R1酵素試薬液(以下、R1試薬) 1バイアル(30mL)
- ② R2酵素試薬液(以下、R2試薬) 1バイアル(30mL)
- ③ L-グルタミン標準液(250mg/L、凍結乾燥品)1バイアル(0.5mL)

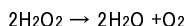
【測定原理】

試料にR1試薬を添加すると、L-グルタミン酸オキシダーゼの作用により試料中のL-グルタミン酸は酸化され、過酸化水素を生成します。この過酸化水素はカタラーゼの作用により分解されるので、予め試料中に含まれていたL-グルタミン酸が除去されます。続いてR2試薬を添加すると、グルタミンナーゼの作用により試料中のL-グルタミンはL-グルタミン酸に分解されます。このL-グルタミン酸はL-グルタミン酸オキシダーゼの作用により酸化され、過酸化水素を生成します。生成された過酸化水素からペルオキシダーゼの作用によるTOOSと4-アミノアンチピリンとの酸化縮合反応で紫色色素が生成されます。この紫色の吸光度(555nm)から試料中のL-グルタミン濃度を定量します。なお、カタラーゼはR2試薬添加直後にアジ化ナトリウムによってただちに失活します。

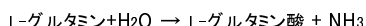
1) L-グルタミン酸オキシダーゼによるL-グルタミン酸の酸化



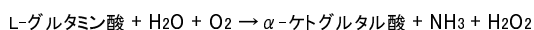
2) カタラーゼによるL-グルタミン酸由来の過酸化水素の除去



3) グルタミンナーゼによるL-グルタミンの分解



4) L-グルタミン由来L-グルタミン酸の酸化



5) ペルオキシダーゼによる紫色色素の生成



【操作方法】

1. 試薬の調製

1) L-グルタミン標準液

L-グルタミン標準液(凍結乾燥品)は常温に戻して1バイアルあたり0.5mLの精製水を添加し、凍結乾燥品を溶解して使用します。溶解後の標準液は必ず2~8°Cで遮光して保存して下さい。調製後、約1ヶ月間使用できます。長期間保存する場合には-20°C以下で凍結して保存して下さい。

2) R1試薬およびR2試薬

そのまま使用して下さい。

2. 必要な器具・装置・試料等

マイクロピペット(10μL、450μL)、試験管(12×75mm)、試験管立て、ボルテックスミキサー、キュベット、分光光度計、精製水

3. 測定試料の調製

- ① 培地の場合、原液で測定できますが、測定範囲を超えた試料は精製水で適宜希釈して測定してください。
- ② 血清・血漿の場合、原液で測定できますが、希釈する場合は1%(w/v)のBSAを含むPBSを使用してください。

4. 測定操作方法

- ① 試料、標準液、精製水を各試験管に10μLずつ分注します。
- ② R1試薬を各試験管に450μLずつ分注して混和します。
- ③ 20~30°Cで20分間静置します。
- ④ R2試薬を各試験管に450μLずつ分注して混和します。
- ⑤ 20~30°Cで20分間静置後、精製水を対照にして555nmの吸光度を測定します。

5. L-グルタミン濃度の算出

試料中のL-グルタミンの濃度は、吸光度の値を元にして下記の計算式により求めます。

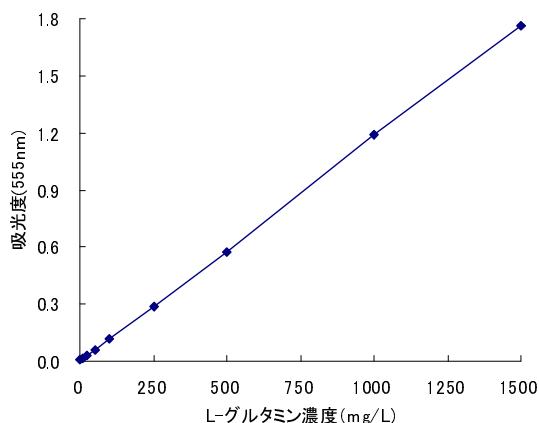
$$\text{L-グルタミン (mg/L)} = (\text{A}-\text{R}) \div (\text{S}-\text{R}) \times 250 \times \text{希釈倍率}$$

	試料用 試験管	標準液用 試験管	精製水用 試験管
試料	10 μL	—	—
標準液	—	10 μL	—
精製水	—	—	10 μL
R1試薬	450 μL	450 μL	450 μL
R2試薬	450 μL	450 μL	450 μL
吸光度	A	S	R

【測定範囲】

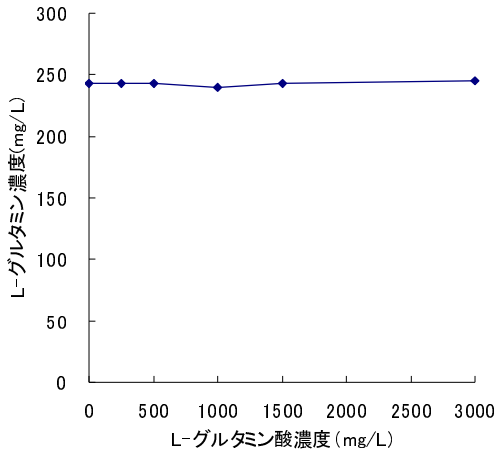
本キットでは10~1500mg/Lの範囲でのL-グルタミンの測定が可能です(下記検量線例参照)。

L-グルタミン検量線例



【試料に共存するL-グルタミン酸の影響】

試料(L-グルタミン約250mg/Lを含む)にL-グルタミン酸が3000mg/L含まれてもL-グルタミン測定は影響を受けません(下図参照)。



【L-アスコルビン酸(ビタミンC)の影響除去について】

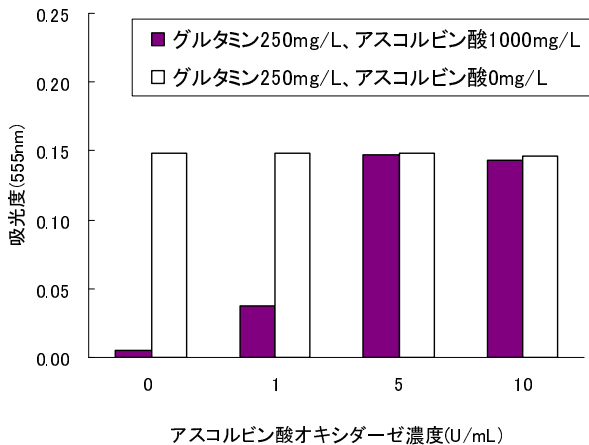
本キットでは、試料中に一定量以上のL-アスコルビン酸が含まれていると発色反応が阻害されます。(例として、L-グルタミン250mg/Lの試料中にL-アスコルビン酸が25mg/L含まれるとき、L-アスコルビン酸が含まれない場合に比べて吸光度が約10%低下します。)したがって、そのような試料のL-グルタミン測定においては適当な前処理をする必要があります。L-アスコルビン酸による発色阻害を除く方法として、アスコルビン酸オキシダーゼによる酵素処理の方法があります。

【アスコルビン酸オキシダーゼによる前処理例】

- ①試料(L-グルタミン250mg/L、L-アスコルビン酸1000mg/Lの水溶液)に、10 μ Lのアスコルビン酸オキシダーゼ溶液(PBSで希釈して5U/mLに調製)を混合して、試料を2倍希釈する。
- ②10分間室温で静置する。

これを試料として測定すれば、元の試料にL-アスコルビン酸が1000mg/L含まれていてもL-グルタミン測定は影響を受けません。(下図参照)

試料の前処理の際には念のため、試料に適当量のL-グルタミンを添加したものを同時に測定し、その回収率に問題のないことを確認することをおすすめします。



【使用上又は取扱上の注意】

- ①紫色色素の発色において、L-グルタミン標準液を検体とした場合、R2試薬の添加から約5分間でピークに達した後、経時的な微弱減少が見られます。検体試料および標準液の反応時間ならびに吸光度測定までの時間に極端な差異が生じないように留意して下さい。
- ②R1試薬およびR2試薬は2~8°Cで遮光して保存して下さい。
- ③試薬が誤って目や口に入ったり皮膚に付着した場合は、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けて下さい。
- ④R2試薬にはアジ化ナトリウム(0.1%以下)が含まれています。アジ化ナトリウムは鉛や銅などと反応して爆発性の強い金属アジドを生成する危険性がありますので、廃棄の際には大量の水で希釈して流して下さい。
- ⑤アジ化ナトリウムの添加された試料は、正確なL-グルタミンの定量ができない可能性があるため、使用しないで下さい。
- ⑥血清・血漿等の生体試料の測定の際は、ウイルス等の感染性のものを含む場合がありますので取扱いには十分注意して下さい。そのような試料に接触した器具、試薬及び試薬容器等は感染の危険のあるものとして、オートクレーブ等で滅菌処理するか、1%次亜塩素酸等の消毒薬に浸して処理して下さい。
- ⑦試薬の安定性を低下させるおそれがあるため、試薬容器内でR1試薬とR2試薬が互いに混ざらないように注意して下さい。
- ⑧使用期限を過ぎたキットは使用しないで下さい。
- ⑨ロットの異なる構成試薬を組み合わせ使用しないで下さい。また、ロットの異なる試薬は混合しないで下さい。
- ⑩本キットは生体内への注射又は服用はしないで下さい。
- ⑪添付文書に記載された使用方法に従って使用して下さい。

【貯蔵方法・使用期限】

貯蔵方法: 2~8°Cで遮光して保存
使用期限: 製造日から6ヶ月

【製品コード】

【参考文献】

1. Arima J et al., J Biochem 134, 805-812, 2003

【問い合わせ先】

ヤマサ醤油株式会社 診断薬部
〒103-0014 東京都中央区日本橋蛸殻町1-23-8
TEL 03(3668)8558 FAX 03(3668)8407

【製造販売】



ヤマサ醤油株式会社

千葉県銚子市新生町2-10-1
TEL 0479-22-0095