

谷氨酸(glutamic acid, Glu)含量测定试剂盒说明书

(微板法 96 样)

一、产品简介：

谷氨酸广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，不仅是组成蛋白质的 20 种氨基酸之一，也是细胞代谢中的关键分子。此外，谷氨酸不仅是哺乳动物神经系统中最丰富的快速兴奋性神经递质；也存在于多种食品中，并已用作食品工业中的增味剂。

本试剂盒提供一种快速、灵敏的检测谷氨酸的方法，利用谷氨酸脱氢酶特异作用于底物谷氨酸，同时使生成的物质进一步与显色剂反应生成黄色物质，该黄色物质在 450nm 处有最大吸收峰，进而得出谷氨酸的含量。

二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 70mL×2 瓶	4℃保存	
试剂一	液体×1 支	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，避免试剂浪费。
试剂二	液体 4mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉体 mg×1 支	-20℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，再加 1.2mL 蒸馏水溶解，仍-20℃保存
试剂四	液体 2mL×1 瓶	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部，避免试剂浪费。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水。

四、谷氨酸(Glu)含量测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

1、样本制备：

- ① 组织样本：0.1g 组织样本（水分充足的样本建议取 0.5g 左右），加 1mL 的提取液研磨，粗提液全部转移到 EP 管中，再加入 1 μ L 的试剂一，混匀并孵育 5min；12000rpm，离心 10min，上清液待测。
- ② 高蛋白含量样本：取 0.1g 组织样本，加适量高氯酸（1M）研磨样本，再用 KOH（5M）调溶液 PH 值至约 8，两次液体体积记为 V2，再加入 1 μ L 的试剂一，混匀并孵育 5min；粗提液全部转移到 EP 管中。4600rpm 离心 10min，上清液待测。
- ③ 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

- ④ 液体样品：近似中性的液体样品可直接取 1mL 转移到 EP 管中，再加入 1 μ L 的试剂一，混匀并孵育 5min；12000rpm，离心 10min，上清液待测。
酸性液体样本（如葡萄酒或果汁），则需先用 KOH（5M）调溶液的 PH 值至约 8，并在室温下孵育 30 分钟。取 1mL 转移到 EP 管中，再加入 1 μ L 的试剂一，混匀且孵育 5min；12000rpm，离心 10min，上清液待测。

2、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。
- ② 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
提取液	140	150
试剂二	20	20
试剂三	10	
样本	20	20
试剂四	10	10

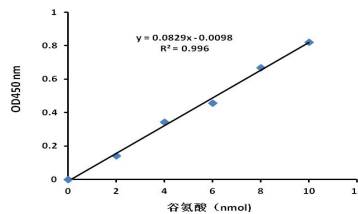
混匀, 30°C (恒温培养箱) 避光反应 20min (若反应未终止即吸光值还在上升, 须延长反应时间至吸光值不变), 于 450nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本需设置一个对照)。

【注】1.若 ΔA 小于 0.01, 可增加样本加样量 V1 (如增至 40μL 或更多), 则提取液相应减少。改变后的 V1 需代入公式重新计算。

2.若 A 测定管值大于 1.5, 可对样本用蒸馏水进行稀释, 或减少样本加样量 V1 (如减至 10μL 或更少), 则提取液相应增加。则稀释倍数 D 和改变后的 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程为 $y=0.0829x-0.0098$; x 为谷氨酸含量 (nmol), y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

$$\text{谷氨酸含量(nmol/g 鲜重)}=[(\Delta A+0.0098)\div 0.0829]\div (W\times V1\div V)=603.14\times(\Delta A+0.0098)\div W$$

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重})&=[(\Delta A+0.0098)\div 0.0829]\div (W\times V1\div V)\times Mr\times 10^{-3} \\ &=88.74\times(\Delta A+0.0098)\div W \end{aligned}$$

3、按照样本质量计算 (高蛋白含量样本):

$$\text{谷氨酸含量(nmol/g 鲜重)}=[(\Delta A+0.0098)\div 0.0829]\div (W\times V1\div V2)=603.14\times(\Delta A+0.0098)\div W\times V2$$

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重})&=[(\Delta A+0.0098)\div 0.0829]\div (W\times V1\div V2)\times Mr\times 10^{-3} \\ &=88.74\times(\Delta A+0.0098)\div W\times V2 \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算:

$$\text{谷氨酸含量 (nmol/10}^4\text{cell)}=[(\Delta A+0.0098)\div 0.0829]\div (500\times V1\div V)=603.14\times(\Delta A+0.0098)\div 500$$

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/10}^4\text{cell})&=[(\Delta A+0.0098)\div 0.0829]\div (500\times V1\div V)\times Mr\times 10^{-3} \\ &=88.74\times(\Delta A+0.0098)\div 500 \end{aligned}$$

5、按照液体体积计算:

$$\text{谷氨酸含量(nmol/mL)}=[(\Delta A+0.0098)\div 0.0829]\div (V1\div V3)=603.14\times(\Delta A+0.0098)$$

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/mL)}=[(\Delta A+0.0098)\div 0.0829]\div (V1\div V3)\times Mr\times 10^{-3}=88.74\times(\Delta A+0.0098)$$

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入反应体系中样本体积, 0.02mL;

V2---高蛋白含量样本的总提取液体积; V3---所取液体的体积, 1 mL;

W---样本质量, g;

500---细胞数量, 万;

谷氨酸分子量 Mr---147.13。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (50nmol/μL): 标准品用 1mL 的蒸馏水溶解。(母液需在两天内用且-20°C保存)。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. nmol/μL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。