

谷氨酸(glutamic acid, Glu)含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-F-AJS020 分光法 48 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 120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 8mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 1 支	-20°C保存	临用前加 1.2mL 蒸馏水溶解,仍-20°C保存。
试剂三	液体 2mL×1 瓶	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部,避免试剂浪费。
标准品	粉体 1 支	4°C保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)、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,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,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°C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(10^4):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,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 2 M NaOH 调溶液的 PH 值至约 8.6,并在室温下孵育 30 分钟。取 1mL 转移到 EP 管中,12000rpm,离心 10min,上清液待测。

2、上机检测:

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 450nm,蒸馏水调零。
- ② 在 1mL 玻璃比色皿(光径 1cm)中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管	对照管
提取液	530	550
试剂一	80	80
试剂二	20	
样本	50	50
试剂三	20	20

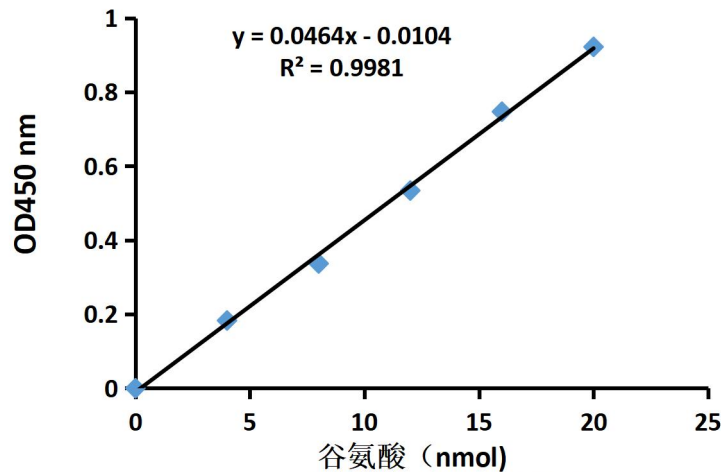
混匀，30°C（恒温培养箱）避光反应 20min（若反应未终止即吸光值还在上升，须延长反应时间至吸光值不变），于 450nm 下读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-A 对照（每个样本需设置一个对照）。

【注】1.若 ΔA 小于 0.01，可增加样本加样量 V1（如增至 100 μ L 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 20 μ L 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 $y = 0.0464x - 0.0104$ ；x 为谷氨酸含量（nmol），y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算：

$$\text{谷氨酸含量(nmol/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0104) \div 0.0464] \div (W \times V1 \div V) = 431 \times (\Delta A + 0.0104) \div W$$

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0104) \div 0.0464] \div (W \times V1 \div V) \times Mr \times 10^{-3} = 63.42 \times (\Delta A + 0.0104) \div W$$

3、按照样本质量计算（高蛋白含量样本）：

$$\text{谷氨酸含量(nmol/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0104) \div 0.0464] \div (W \times V1 \div V2) = 431 \times (\Delta A + 0.0104) \div W \times V2$$

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0104) \div 0.0464] \div (W \times V1 \div V2) \times Mr \times 10^{-3} \\ &= 63.42 \times (\Delta A + 0.0104) \div W \times V2 \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算：

$$\text{谷氨酸含量(nmol/10}^4\text{cell)} = [(\Delta A + 0.0104) \div 0.0464] \div (500 \times V1 \div V) = 431 \times (\Delta A + 0.0104) \div 500$$

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/10}^4\text{cell}) &= [(\Delta A + 0.0104) \div 0.0464] \div (500 \times V1 \div V) \times Mr \times 10^{-3} \\ &= 63.42 \times (\Delta A + 0.0104) \div 500 \end{aligned}$$

5、按照液体体积计算：

$$\text{谷氨酸含量(nmol/mL)} = [(\Delta A + 0.0104) \div 0.0464] \div (V1 \div V3) = 431 \times (\Delta A + 0.0104)$$

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A + 0.0104) \div 0.0464] \div (V1 \div V3) \times Mr \times 10^{-3} = 63.42 \times (\Delta A + 0.0104)$$

V---加入提取液体积，1 mL； V1---加入反应体系中样本体积，0.05mL；

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/ μ L）：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：0,0.08, 0.16, 0.24, 0.32, 0.4. nmol/ μ L。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。