

谷氨酸(glutamic acid, Glu)含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-F-AJS007-48 紫外分光法 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。

本试剂盒利用谷氨酸脱氢酶特异作用于底物谷氨酸, 同时使 NAD^+ 转化为 NADH , 利用 NADH 在 340nm 的上升量计算得出谷氨酸含量。

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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 1 支	4°C保存	用前甩几下使粉体落入底部, 再加 1.2mL 蒸馏水溶解; 溶解后-20°C保存。
试剂三	粉体 1 支	-20°C保存	用前甩几下使粉体落入底部, 再加 1.2mL 蒸馏水溶解, 溶解后仍-20°C保存。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (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:

1、样本制备:

- 称取约 0.1g 组织(水分充足的样本可取约 0.5g), 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆, 12000rpm, 室温离心 10min, 取上清液待测。(若组织样本蛋白含量很高, 可进行脱蛋白处理)

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 5~10: 1 的比例进行提取

② 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。

- 液体样品: 近似中性的澄清液体样本可直接检测; 若为酸性样本则需先用 $\text{NaOH}(2\text{M})$ 调 PH 值约 7.4, 然后室温静置 30min, 取澄清液体直接检测。

2、上机检测:

- 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	600
试剂二	20
样本	80
30°C 孵育 5min, 看是否增长, 读取 A1	
试剂三	20
混匀, 30°C 孵育 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 340nm 读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】1. 若 ΔA 的值在零附近徘徊，可以增加样本量 V_1 （如由 $80\mu\text{L}$ 增至 $150\mu\text{L}$ ，则试剂一相应减少，总体积不变）或样本准备制备的时候，增加样本质量 W 和细胞数量，则改变后的 V_1 或 W 或细胞数量需代入计算公式重新计算。

2.若 A_1 值超过 1.6，可减少样本加样量 V_1 （如由 $80\mu\text{L}$ 减至 $40\mu\text{L}$ ，则试剂一相应增加，总体积不变），则改变后的 V_1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照样品质量计算：

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times Mr \times 10^6] \div (W \times V_1 \div V) = 210.2 \times \Delta A \div W$$

2、按细胞数量计算：

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times Mr \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V_1 \div V)$$

$$= 467.1 \times \Delta A \div \text{细胞数量}$$

2、按照液体体积计算：

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g}/\text{mL})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times Mr \times 10^6] \div V_1 = 210.2 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.3 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ---光径， 1cm ；

V ---加入提取液体积， 1mL ；

V_1 ---加入反应体系中样本体积， 0.08mL ；

V_2 ---反应总体积， $7.2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

Mr ---谷氨酸分子量， 147.13 ；

W ---样本质量， g ；

细胞数量---万。