

谷氨酸(glutamic acid, Glu)含量测定试剂盒说明书

(货号: BP10366F 分光法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 1 支	-20°C保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 临用前加 1.2mL 蒸馏水溶解, 仍-20°C保存。
试剂三	液体 2.5mL×1 瓶	4°C避光保存	1. 开盖前注意使试剂落入底部 (可手动甩一甩), 避免试剂浪费; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉体 1 支	4°C保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

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、样本提取:

- 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、检测步骤：

- ① 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：

试剂组分 (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

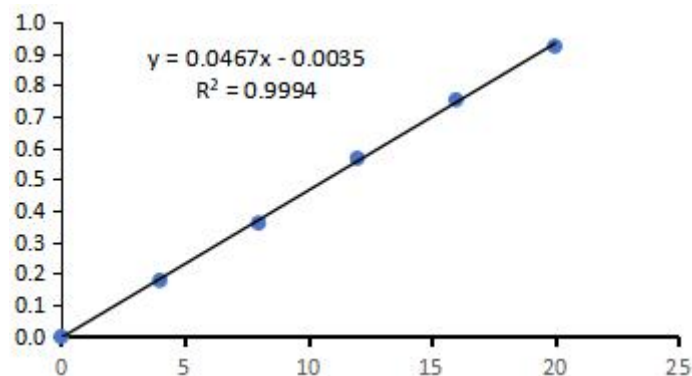
混匀，30℃（恒温培养箱）避光反应 20min（若反应未终止即吸光值还在上升，须延长反应时间至吸光值不变），于 450nm 下读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本需设置一个对照）。

【注】1. 若 ΔA 小于 0.01，可增加样本加样量 V_1 （如增至 100μL 或更多），则提取液相应减少。改变后的 V_1 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 V_1 （如减至 20μL 或更少），则提取液相应增加。则稀释倍数 D 和改变后的 V_1 需代入公式重新计算

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 0.0467x - 0.0035$ ；x 为谷氨酸含量（nmol），y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算：

$$\text{谷氨酸含量 (nmol/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0035) \div 0.0467] \div (W \times V_1 \div V) = 428.3 \times (\Delta A + 0.0035) \div W$$

$$\text{谷氨酸含量 (μg/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0035) \div 0.0467] \div (W \times V_1 \div V) \times Mr \times 10^{-3} = 63 \times (\Delta A + 0.0035) \div W$$

3、按照样本质量计算（高蛋白含量样本）：

$$\text{谷氨酸含量 (nmol/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0035) \div 0.0467] \div (W \times V_1 \div V_2) = 428.3 \times (\Delta A + 0.0035) \div W \times V_2$$

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸含量 (μg/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0035) \div 0.0467] \div (W \times V_1 \div V_2) \times Mr \times 10^{-3} \\ &= 63 \times (\Delta A + 0.0035) \div W \times V_2 \end{aligned}$$

4、按照蛋白浓度计算：

$$\text{谷氨酸含量 (nmol/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0035) \div 0.0467] \div (C_{pr} \times V_1 \div V) = 428.3 \times (\Delta A + 0.0035) \div C_{pr}$$

$$\text{谷氨酸含量 (μg/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0035) \div 0.0467] \div (C_{pr} \times V_1 \div V) \times Mr \times 10^{-3} = 63 \times (\Delta A + 0.0035) \div C_{pr}$$

5、按照蛋白浓度计算（高蛋白含量样本）：

$$\text{谷氨酸含量 (nmol/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0035) \div 0.0467] \div (C_{pr} \times V_1 \div V_2) = 428.3 \times (\Delta A + 0.0035) \div C_{pr} \times V_2$$

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸含量 (μg/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0035) \div 0.0467] \div (C_{pr} \times V_1 \div V_2) \times Mr \times 10^{-3} \\ &= 63 \times (\Delta A + 0.0035) \div C_{pr} \times V_2 \end{aligned}$$

6、按细胞数量计算：

$$\text{谷氨酸含量 (nmol/10}^4\text{cell)} = [(\Delta A + 0.0035) \div 0.0467] \div (500 \times V_1 \div V) = 428.3 \times (\Delta A + 0.0035) \div 500$$

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g}/10^4\text{cell})=[(\Delta A+0.0035)\div 0.0467]\div(500\times V1\div V)\times Mr\times 10^{-3}$$

$$=63\times(\Delta A+0.0035)\div 500$$

7、按照液体体积计算：

$$\text{谷氨酸含量}(\text{nmol}/\text{mL})=[(\Delta A+0.0035)\div 0.0467]\div(V1\div V3)=428.3\times(\Delta A+0.0035)$$

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g}/\text{mL})=[(\Delta A+0.0035)\div 0.0467]\div(V1\div V3)\times Mr\times 10^{-3}=63\times(\Delta A+0.0035)$$

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 标准品用 1mL 的蒸馏水溶解。（母液需在两天内用且-20℃保存），标准品母液浓度为 50nmol/μL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0,0.08, 0.16, 0.24, 0.32, 0.4 nmol/μL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

1. 吸取标准品母液 200uL，加入 800uL 蒸馏水，混匀得到 10nmol/μL 的标品稀释液；						
2. 吸取 10nmol/μL 的标品稀释液 40uL，加入 960uL 蒸馏水，混匀得到 0.4nmol/μL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 nmol/μL	0	0.08	0.16	0.24	0.32	0.4
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
提取液	530	550
试剂一	80	80
试剂二	20	
标品	50	
蒸馏水		50
试剂三	20	20
混匀，30℃（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，△A=A 测定-0 浓度管。		