

谷氨酸(glutamic acid, Glu)含量测定试剂盒说明书

(货号: BP10366W 微板法 96 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 70mL×2 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 1 支	-20℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 1.2mL 蒸馏水溶解, 仍-20℃保存。
试剂三	液体 2.5mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使液体落入底部(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℃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)、96 孔板、离心管、酶标仪、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℃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 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, 12000rpm, 离心 10min, 上清液待测。

2、检测步骤:

- 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:

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
提取液	140	150
试剂一	20	20
试剂二	10	
样本	20	20
试剂三	10	10

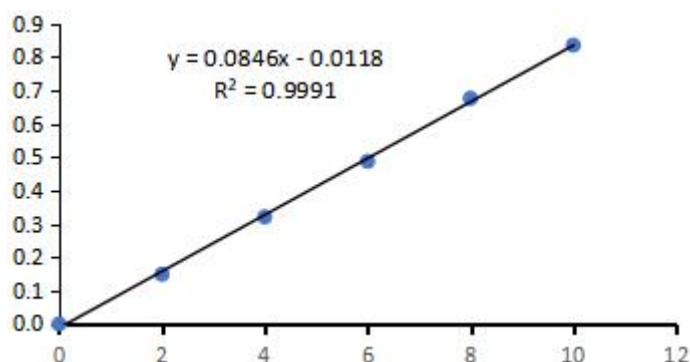
混匀, 30°C (恒温培养箱) 避光反应 20min (若反应未终止即吸光值还在上升, 须延长反应时间至吸光值不变), 于 450nm 下读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本需设置一个对照)。

【注】1. 若 ΔA 小于 0.01, 可增加样本加样量 V_1 (如增至 40μL 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 10μL 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 $y = 0.0846x - 0.0118$; x 为谷氨酸含量 (nmol), y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

$$\text{谷氨酸含量 (nmol/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0118) \div 0.0846] \div (W \times V_1 \div V) = 591 \times (\Delta A + 0.0118) \div W$$

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸含量 (μg/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0118) \div 0.0846] \div (W \times V_1 \div V) \times M_r \times 10^{-3} \\ &= 87 \times (\Delta A + 0.0118) \div W \end{aligned}$$

3、按照样本质量计算 (高蛋白含量样本):

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸含量 (nmol/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0118) \div 0.0846] \div (W \times V_1 \div V_2) = 591 \times (\Delta A + 0.0118) \div W \times V_2 \\ \text{谷氨酸含量 (μg/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0118) \div 0.0846] \div (W \times V_1 \div V_2) \times M_r \times 10^{-3} \\ &= 87 \times (\Delta A + 0.0118) \div W \times V_2 \end{aligned}$$

4、按照蛋白浓度计算:

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸含量 (nmol/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0118) \div 0.0846] \div (C_{pr} \times V_1 \div V) = 591 \times (\Delta A + 0.0118) \div C_{pr} \\ \text{谷氨酸含量 (μg/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0118) \div 0.0846] \div (C_{pr} \times V_1 \div V) \times M_r \times 10^{-3} \\ &= 87 \times (\Delta A + 0.0118) \div C_{pr} \end{aligned}$$

5、按照蛋白浓度计算 (高蛋白含量样本):

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸含量 (nmol/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0118) \div 0.0846] \div (C_{pr} \times V_1 \div V_2) = 591 \times (\Delta A + 0.0118) \div C_{pr} \times V_2 \\ \text{谷氨酸含量 (μg/mg prot)} &= [(\Delta A + 0.0118) \div 0.0846] \div (C_{pr} \times V_1 \div V_2) \times M_r \times 10^{-3} \\ &= 87 \times (\Delta A + 0.0118) \div C_{pr} \times V_2 \end{aligned}$$

6、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸含量 (nmol/10}^4 \text{cell)} &= [(\Delta A + 0.0118) \div 0.0846] \div (500 \times V_1 \div V) = 591 \times (\Delta A + 0.0118) \div 500 \\ \text{谷氨酸含量 (μg/10}^4 \text{cell)} &= [(\Delta A + 0.0118) \div 0.0846] \div (500 \times V_1 \div V) \times M_r \times 10^{-3} \\ &= 87 \times (\Delta A + 0.0118) \div 500 \end{aligned}$$

7、按照液体体积计算：

谷氨酸含量(nmol /mL)=[(ΔA+0.0118)÷0.0846]÷(V1÷V3)=591×(ΔA+0.0118)

谷氨酸含量(μg /mL)=[(ΔA+0.0118)÷0.0846]÷(V1÷V3)×Mr×10⁻³=87×(ΔA+0.0118)

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 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, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. 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 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 5nmol/μL 的标品稀释液；						
2. 吸取 5nmol/μL 的标品稀释液 100uL，加入 900uL 蒸馏水，混匀得到 0.5nmol/μL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 nmol/μL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
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	140	150
试剂一	20	20
试剂二	10	
标品	20	
蒸馏水		20
试剂三	10	10
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，ΔA=A 测定-0 浓度管。		