

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 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 16mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 mg×1 支	4℃保存	临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℃保存。
试剂三	粉体 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加 1.2mL 蒸馏水溶解，溶解后可-20℃分装保存。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	仅用来鉴定试剂盒中试剂是否正常(不参与结果计算)。 使用方法：用前标准管 (Glu) 甩几下使粉剂落入底部，再加 0.5mL 蒸馏水混匀溶解即浓度为 100 $\mu\text{mol/mL}$ ，再稀释 50 倍成 2 $\mu\text{mol/mL}$ 的 Glu 后备用；按照加样表中测定管操作 (样本更换成备用浓度标准品)。

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、水浴锅、冰、蒸馏水。

四、谷氨酸 (Glu) 含量测定：

1、样本制备：

① 组织样本：

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℃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。

③ 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 NaOH(2M) 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：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。

② 试剂解冻至室温 (25℃)，或可放在 25℃条件下水浴 5-15min。

③ 试剂一和二可按照 160:10 比例配成混合液 (一枪加 170 μL 该混合液) (该混合液用多少配多

少，现配现用）。

④ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（ μL ）	测定管
样本	20
试剂一	160
试剂二	10
混匀，于室温（25℃）下孵育 2min 后于 340nm 下读取 A1。	
试剂三	10
混匀（轻轻拍打板子几下），于室温（25℃）下孵育 10min 后于 340nm 下读取 A2，（若吸光度继续上升，直到吸光值保持 2min 内稳定不变为止） $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】若 ΔA 小于 0.01，可增加样本量 $V1$ （如由 20 μL 增至 50 μL ，则试剂一相应减少，总体积不变）或增加样本取样质量 W 和细胞数量，则改变后的 $V1$ 或 W 或细胞数量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：

谷氨酸（Glu）含量($\mu\text{g/g}$ 鲜重)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6$] $\div (W \times V1 \div V)$ =467.1 $\times \Delta A \div W$

2、按细胞数量计算：

谷氨酸（Glu）含量($\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}$)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6$] $\div (\text{细胞数量} \times V1 \div V)$
=467.1 $\times \Delta A \div \text{细胞数量}$

3、按照液体体积计算：

谷氨酸（Glu）含量($\mu\text{g/mL}$)=[$\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times Mr \times 10^6$] $\div V1$ =467.1 $\times \Delta A$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数，6.3 $\times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ---96 孔板光径，0.5cm；

V ---加入提取液体积，1 mL；

$V1$ ---加入反应体系中样本体积，0.02mL；

$V2$ ---反应总体积，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。