

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，溶解后仍-20℃保存。

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、冰、蒸馏水。

四、谷氨酸（Glu）含量测定：

1、样本制备：

- ① 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 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，2min 后于 340nm 下读取 A1	
试剂三	10
混匀（轻轻拍打板子几下），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）	

$$\Delta A = A_2 - A_1。$$

【注】若 ΔA 的值在零附近徘徊，可以增加样本量 V_1 （如由 20 μ L 增至 50 μ 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 ，则改变后的 V_1 或 W 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：

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times Mr \times 106] \div (W \times V_1 \div V) = 467.1 \times \Delta A \div W$$

2、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned}\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times Mr \times 10^6] \div (\text{细胞数量} \times V_1 \div V) \\ &= 467.1 \times \Delta A \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times Mr \times 106] \div V_1 = 467.1 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， 6.3×10^3 L/mol/cm； d ---96 孔板光径，0.5cm；

V ---加入提取液体积，1 mL；

V_1 ---加入反应体系中样本体积，0.02mL；

V_2 ---反应总体积， 2×10^{-4} L；

Mr ---谷氨酸分子量，147.13；

W ---样本质量，g；

细胞数量--- 500 万。