

谷氨酸(glutamic acid, Glu)含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-AJS007 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 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 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) $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【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：

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times \text{Mr} \times 10^6] \div (W \times V_1 \div V) = 467.1 \times \Delta A \div W$$

2、按细胞数量计算：

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

3、按照液体体积计算：

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times \text{Mr} \times 10^6] \div V_1 = 467.1 \times \Delta A$$

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；

V_1 ---加入反应体系中样本体积，0.02mL；

V_2 ---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。