

谷氨酸(glutamic acid, Glu)含量测定试剂盒说明书

(紫外分光法 48 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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 mg×1 支	4°C保存	使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°C保存。
试剂三	粉体 mg×1 支	-20°C保存	使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°C保存。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿(光径 1cm)、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:

- 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°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(10⁴):提取液(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

- 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:

- 紫外分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 340nm,蒸馏水调零。
- 在 1mL 石英比色皿(光径 1cm)中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管
试剂一	600
试剂二	20
样本	80
30°C孵育 5min,看是否增长,读取 A1	
试剂三	20

混匀，30℃孵育 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 340nm 读取 A2， $\Delta A=A_2-A_1$ 。

【注】1. 若 ΔA 的值在零附近徘徊，可以增加样本量 V1（如由 80 μ L 增至 150 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 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。

2. 若 A1 值超过 1.6，可减少样本加样量 V1（如由 80 μ L 减至 40 μ L，则试剂一相应增加，总体积不变），则改变后的 V1 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：

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重})=[\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_2 \times \text{Mr} \times 10^6] \div (W \times V_1 \div V) = 210.2 \times \Delta A \div W$$

2、按细胞数量计算：

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

2、按照液体体积计算：

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/mL}) = [\Delta A \div (\varepsilon \times d) \times V_2 \times \text{Mr} \times 10^6] \div V_1 = 210.2 \times \Delta A$$

ε ---NADH 摩尔消光系数， 6.3×10^3 L/mol/cm； d---光径，1cm；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入反应体系中样本体积，

0.08mL；

V2---反应总体积， 7.2×10^{-4} L；

Mr---谷氨酸分子量，147.13；

W---样本质量，g；

细胞数量---万。
