# 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）。<br>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 100μmol/mL，再稀释 50 倍成 2μmol/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 170μL 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）△A=A2-A1。 | |

**【注】若△A 小于 0.01，可增加样本量 V1（如由 20μL 增至 50μL，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(μg/g 鲜重)=[ΔA÷(ε×d)×V2×Mr×$10^6$]÷(W×V1÷V)=467.1×ΔA÷W

2、按细胞数量计算：

谷氨酸（Glu）含量(μg/$10^4$ cell)=[ΔA÷(ε×d)×V2×Mr×$10^6$]÷(细胞数量×V1÷V)

=467.1×ΔA÷细胞数量

3、按照液体体积计算：

谷氨酸（Glu）含量(μg/mL)=[ΔA÷(ε×d)×V2×Mr×$10^6$]÷V1=467.1×ΔA

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；　V1---加入反应体系中样本体积，0.02mL；

V2---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---万。