

Glutamic Acid Content Assay Kit

谷氨酸(Glu)含量测定试剂盒说明书

货号: BN72234 | 方法: 微板法 | 规格: 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°C 保存	
试剂一	液体 16mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉体 mg×1 支	4°C 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°C 保存。
试剂三	粉体 mg×1 支	-20°C 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°C 分装保存。
标准品	粉体 mg×1 支	4°C 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°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 (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） $\Delta A = A2 - A1$ 。	

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

- 1、按照样品质量计算：

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

- 2、按细胞数量计算：

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

- 3、按照液体体积计算：

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

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。