

谷氨酸(glutamic acid, Glu)含量测定试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

Glu 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，而且通过转氨基作用参与多种氨基酸合成，是生物体内主要氨基来源之一。此外，Glu 还是味精的主要有效成分，常用做食品添加剂以及香料生产。

测定原理：

利用专用提取液提取，然后用显色剂进行显色，显色后在 570nm 下进行测定。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰、蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：液体 120mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；临用前加入 5mL 蒸馏水充分溶解混匀，用不完的试剂仍 4℃ 保存。

谷氨酸提取：

1、细菌或培养细胞样品：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量 (10^4 个)：试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一)，超声波破碎细菌或细胞 (冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)；8000g 常温离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、组织样品：按照组织质量 (g)：试剂一体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一)，进行冰浴匀浆。8000g 常温离心 10min，取上清，置冰上待测。

3、血清 (浆) 或细胞培养液样品：按照血清 (浆) 或细胞培养液体积 (mL)：试剂一体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议取 0.1mL 血清 (浆) 或者细胞培养液加入 1mL 试剂一)，进行冰浴匀浆。8000g 常温离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 570nm，蒸馏水调零。

2、在盖 EP 管中加入下列试剂：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	250	
试剂一		250
试剂二	50	50

混匀，90℃ 水浴 20min (盖紧，以防止水分散失)，流水冷却，取 200μL 至微量石英比色皿或 96 孔板中，于 570nm 波长处记录吸光值 A。△A=A 测定管-A 对照管。对照管只要做一管。

注意事项：

为提高检测灵敏度，测定管的吸光值应小于 1，若大于 1 则需要将上清液用试剂一稀释至适当倍数后测定，计算公式中乘以相应稀释倍数。

谷氨酸含量计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 0.0328x - 2.423$ ； x 为谷氨酸含量 ($\mu\text{g/mL}$)， y 为吸光值。

2、按照血清（浆）或者细胞培养液体积计算

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A + 2.423) \div 0.0328 \times V_1] \div (V_3 \times V_1 \div V_2) = 304.9 \times (\Delta A + 2.423)$$

3、按照蛋白浓度计算

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/mg prot}) = [(\Delta A + 2.423) \div 0.0328 \times V_1] \div (V_1 \times \text{Cpr}) = 30.49 \times (\Delta A + 2.423) \div \text{Cpr}$$

4、按照样本质量计算

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A + 2.423) \div 0.0328 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V_2) = 61 \times (\Delta A + 2.423) \div W$$

5、按照细菌或细胞密度计算

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 2.423) \div 0.0328 \times V_1] \div (1000 \times V_1 \div V_2) = 0.061 \times (\Delta A + 2.423)$$

V_1 ：加入反应体系中样本体积，0.25mL； V_2 ：加入提取液体积，1 mL； V_3 ：加入血清（浆）或细胞培养液体积，0.1 mL； Cpr ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

1、标准条件下测定回归方程为 $y = 0.0164x - 2.423$ ； x 为谷氨酸含量 ($\mu\text{g/mL}$)， y 为吸光值。

2、按照血清（浆）或者细胞培养液体积计算

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A + 2.423) \div 0.0164 \times V_1] \div (V_3 \times V_1 \div V_2) = 609.8 \times (\Delta A + 2.423)$$

3、按照蛋白浓度计算

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/mg prot}) = [(\Delta A + 2.423) \div 0.0164 \times V_1] \div (V_1 \times \text{Cpr}) = 60.98 \times (\Delta A + 2.423) \div \text{Cpr}$$

4、按照样本质量计算

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A + 2.423) \div 0.0164 \times V_1] \div (W \times V_1 \div V_2) = 60.98 \times (\Delta A + 2.423) \div W$$

5、按照细菌或细胞密度计算

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 2.423) \div 0.0164 \times V_1] \div (500 \times V_1 \div V_2) = 0.122 \times (\Delta A + 2.423)$$

V_1 ：加入反应体系中样本体积，0.25mL； V_2 ：加入提取液体积，1 mL； V_3 ：加入血清（浆）或细胞培养液体积，0.1 mL； Cpr ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

注意：该试剂盒仅适用于发酵液或组织中谷氨酸含量测定，检测下限为 70 $\mu\text{g/mL}$ 。