

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（10⁴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. 在有盖EP管中加入下列试剂：

试剂名称（ μ L）	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200 μ L至微量石英比色皿或96孔板中，于570nm波长处记录吸光值A。

$\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。对照管只要做一管。

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 $y = 0.0074x - 0.5255$; 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

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A + 0.5255) \div 0.0074 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 1351 \times (\Delta A + 0.5255)$$

3、按照蛋白浓度计算

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/mg prot}) = [(\Delta A + 0.5255) \div 0.0074 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 135.1 \times (\Delta A + 0.5255) \div \text{Cpr}$$

4、按照样本质量计算

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/g鲜重}) = [(\Delta A + 0.5255) \div 0.0074 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 135.1 \times (\Delta A + 0.5255) \div W$$

5、按照细菌或细胞密度计算

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g}/104 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.5255) \div 0.0074 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.27 \times (\Delta A + 0.5255)$$

$V1$: 加入反应体系中样本体积, 0.25mL; $V2$: 加入提取液体积, 1 mL; $V3$: 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 $y = 0.0037x - 0.5255$; 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

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A + 0.5255) \div 0.0037 \times V1] \div (V3 \times V1 \div V2) = 2703 \times (\Delta A + 0.5255)$$

3、按照蛋白浓度计算

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/mg prot}) = [(\Delta A + 0.5255) \div 0.0164 \times V1] \div (V1 \times \text{Cpr}) = 270.3 \times (\Delta A + 0.5255) \div \text{Cpr}$$

4、按照样本质量计算

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/g鲜重}) = [(\Delta A + 0.5255) \div 0.0164 \times V1] \div (W \times V1 \div V2) = 270.3 \times (\Delta A + 0.5255) \div W$$

5、按照细菌或细胞密度计算

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g}/104 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.5255) \div 0.0164 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.541 \times (\Delta A + 0.5255)$$

$V1$: 加入反应体系中样本体积, 0.25mL; $V2$: 加入提取液体积, 1 mL; $V3$: 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:

1、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 $100\mu\text{g/mL}$ 。

2、标准曲线线性范围为: $100\mu\text{g/mL} - 600\mu\text{g/mL}$ 。

3、 ΔA 线性范围为: 0.01-1; 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。
