



谷氨酸(Glu)含量试剂盒(酶法-可见显色)

可见分光光度法

货号: R43905-48S

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。

本试剂盒提供一种快速、灵敏的检测谷氨酸的方法,利用谷氨酸脱氢酶特异作用于底物谷氨酸,同时使生成的物质进一步与显色剂反应生成黄色物质,该黄色物质在450nm处有最大吸收峰,进而得出谷氨酸的含量。

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×1支	4℃保存	用前甩几下使试剂落入试管底部,避免试剂浪费。
试剂二	液体8mL×1瓶	4℃保存	
试剂三	粉体mg×2支	-20℃保存	用前甩几下使试剂落入底部,每支再加0.65mL蒸馏水溶解,可-20℃分装冻存。
试剂四	液体2mL×1瓶	4℃保存	用前甩几下使试剂落入试管底部,避免试剂浪费。
标准品	粉体mg×1支	4℃保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL玻璃比色皿(光径1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰、蒸馏水。

谷氨酸(Glu)含量测定:

建议正式实验前选取2个样本做预测定,了解本批样品和实验流程,避免样本和试剂浪费!



1、样本制备:

①组织样本: 0.1g 组织样本(水分充足的样本建议取0.5g 左右),加1mL的提取液研磨, 粗提液全部转移到EP 管中, 再加入1 μ L 的试剂一, 混匀并孵育5min;12000rpm, 离心10min, 上清液待测。

②高蛋白含量样本: 取0.1g 组织样本, 加适量高氯酸(1M) 研磨样本, 再用KOH(5M)调溶液PH 值至约8,两次液体体积记为V2, 再加入1 μ L 的试剂一, 混匀并孵育5min; 粗提液全部转移到EP 管中。4600rpm 离心10min, 上清液待测。

③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。

④液体样品: 近似中性的液体样品可直接取1mL 转移到EP 管中, 再加入1 μ L 的试剂一, 混匀并孵育5min;12000rpm, 离心10min, 上清液待测。

酸性液体样本(如葡萄酒或果汁),则需先用2M NaOH 调溶液的PH 值至约8.6,并在室温下孵育30分钟。取1mL 转移到EP 管中, 再加入 1 μ L 的试剂一, 混匀且孵育5min;12000rpm, 离心10min, 上清液待测。

2、上机检测:

①可见分光光度计预热30min以上, 调节波长至450nm, 蒸馏水调零。

②所有试剂可于25℃水浴锅中孵育15min 左右后, 再于1mL 玻璃比色皿(光径1cm)中依次加入:

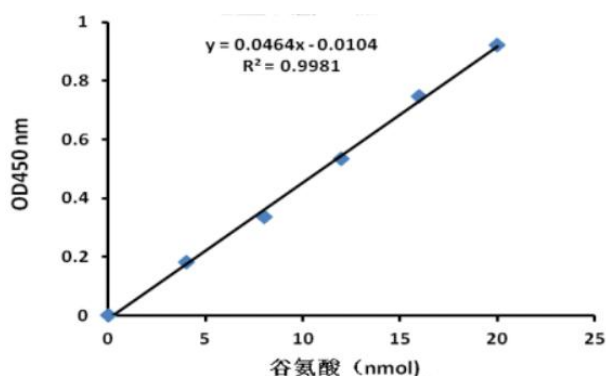
试剂名称(μ L)	测定管	对照管
提取液	530	550
试剂二	80	80
试剂三	20	
样本	50	50
试剂四	20	20



混匀, 30℃(恒温培养箱)避光反应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450nm下读取吸光值A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本需设置一个对照)。

结果计算:

1、标准曲线方程为 $y = 0.0464x - 0.0104$; x 为谷氨酸含量 (nmol), y 为 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

$$\text{谷氨酸 (nmol/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0104) \div 0.0464] \div (W \times V1 \div V) \times D$$

$$= 431 \times (\Delta A + 0.0104) \div W \times D$$

$$\text{谷氨酸 } (\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0104) \div 0.0464] \div (W \times V1 \div V) \times Mr \times 10^{-3} \times D$$

$$= 63.42 \times (\Delta A + 0.0104) \div W \times D$$

3、按照样本质量计算(高蛋白含量样本):

$$\text{谷氨酸 (nmol/g 鲜重)} = [(\Delta A + 0.0104) \div 0.0464] \div (W \times V1 \div V2) \times D$$

$$= 431 \times (\Delta A + 0.0104) \div W \times V2 \times D$$

$$\text{谷氨酸 } (\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0104) \div 0.0464] \div (W \times V1 \div V2) \times Mr \times 10^{-3} \times D$$

$$= 63.42 \times (\Delta A + 0.0104) \div W \times V2 \times D$$

4、按细胞数量计算:

$$\text{谷氨酸 (nmol/10}^4\text{cell)} = [(\Delta A + 0.0104) \div 0.0464] \div (500 \times V1 \div V) \times D$$

$$= 431 \times (\Delta A + 0.0104) \div 500 \times D$$

$$\text{谷氨酸 } (\mu\text{g/10}^4\text{cell)} = [(\Delta A + 0.0104) \div 0.0464] \div (500 \times V1 \div V) \times Mr \times 10^{-3} \times D$$

$$= 63.42 \times (\Delta A + 0.0104) \div 500 \times D$$

5、按照液体体积计算:



$$\text{谷氨酸}(\text{nmol/mL})=[(\Delta A+0.0104)\div 0.0464]\div (V1\div V3)\times D$$

$$=431\times (\Delta A+0.0104)\times D$$

$$\text{谷氨酸}(\mu\text{g/mL})=[(\Delta A+0.0104)\div 0.0464]\div (V1\div V3)\times Mr\times 10^{-3}\times D$$

$$=63.42\times (\Delta A+0.0104)\times D$$

V---加入提取液体积, 1mL;

V1----加入反应体系中样本体积, 0.05mL;

V2----高蛋白含量样本的总提取液体积;

V3---所取液体的体积, 1mL;

D---稀释倍数, 未稀释即为1;

W--- 样本质量, g;

50---细胞数量, 万;

谷氨酸分子量Mr---147.13。

附: 标准曲线制作过程:

1.制备标准品母液(50nmol/L): 标准品用1mL的蒸馏水溶解。(母液需在两天内用且-20℃保存)。

2.把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品:

0,0.08,0.16,0.24,0.32,0.4.nmol/μL。

3.依据测定管加样表操作, 根据结果即可制作标准曲线。