

谷氨酸(glutamic acid, Glu)含量测定试剂盒

微量法 100 管/96 样

注 意：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（μL）	测定管	对照管
提取液（μL）	250	
样品（μL）		250
工作液（μL）	50	50

混匀，90℃水浴 20min（盖紧，以防止水分散失），流水冷却，取 200uL 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。

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（μg/mL），y 为吸光值。

2、按照血清（浆）或者细胞培养液体积计算

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A + 0.5255) \div 0.0074 \times V_1] \div (V_3 \times V_1 \div V_2) = 1351 \times (\Delta A + 0.5255)$$

3、按照蛋白浓度计算

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g/mg prot}) = [(\Delta A + 0.5255) \div 0.0074 \times V_1] \div (V_1 \times \text{Cpr}) = 135.1 \times (\Delta A + 0.5255) \div \text{Cpr}$$

4、按照样本

质量计算

谷氨酸含量($\mu\text{g/g}$ 鲜重)=[$(\Delta A + 0.5255) \div 0.0074 \times V_1$] $\div$ ($W \times V_1 \div V_2$)= $135.1 \times (\Delta A + 0.5255) \div W$ 5、按照细菌或细胞密度计算

谷氨酸含量($\mu\text{g}/10^4\text{ cell}$)=[$(\Delta A + 0.5255) \div 0.0074 \times V_1$] $\div$ ($500 \times V_1 \div V_2$)= $0.27 \times (\Delta A + 0.5255)$

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

谷氨酸含量($\mu\text{g/mL}$)=[$(\Delta A + 0.5255) \div 0.0037 \times V_1$] $\div$ ($V_3 \times V_1 \div V_2$)= $2703 \times (\Delta A + 0.5255)$

3、按照蛋白浓度计算

谷氨酸含量($\mu\text{g}/\text{mg prot}$)=[$(\Delta A + 2.423) \div 0.0164 \times V_1$] $\div$ ($V_1 \times \text{Cpr}$)= $270.3 \times (\Delta A + 0.5255) \div \text{Cpr}$ 4、按照样本质量计算

谷氨酸含量($\mu\text{g/g}$ 鲜重)=[$(\Delta A + 2.423) \div 0.0164 \times V_1$] $\div$ ($W \times V_1 \div V_2$)= $270.3 \times (\Delta A + 0.5255) \div W$ 5、按照细菌或细胞密度计算

谷氨酸含量($\mu\text{g}/10^4\text{ cell}$)=[$(\Delta A + 2.423) \div 0.0164 \times V_1$] $\div$ ($500 \times V_1 \div V_2$)= $0.541 \times (\Delta A + 0.5255)$

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 μ g/mL。
- 2、标准曲线线性范围为: 100 μ g/mL -600 μ g/mL。
- 3、A 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。