

## 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、在有盖 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。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ 。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

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.5255) \div 0.0074 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.27 \times (\Delta A + 0.5255)$$

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

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.5255) \div 0.0164 \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = 0.541 \times (\Delta A + 0.5255)$$

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、 $\Delta A$  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。