

谷氨酸测试盒说明书

(货号: A074-1-2 微板法 96T)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测试原理:

谷氨酸 + NAD^+ + H_2O $\xrightarrow{\text{酶}}$ α -酮戊二酸 + $NADH$ + NH_4^+

二、试剂组成与配制:

(试剂盒有效期 3 个月)

试剂一: 液体 20mL×1 瓶, 室温保存。

试剂二: 液体 20mL×1 瓶, 4℃避光保存。

试剂三: 粉剂×1 支, -20℃保存。稀释液 2mL×1 支, -20℃保存。用时 1 支粉剂加 1 支稀释液, 用不完的试剂-20℃保存, 不可超过 7~10 天。

试剂四: 粉剂×1 支, -20℃保存。稀释液 0.2mL×1 支, -20℃保存。用时 1 支粉剂加 1 支稀释液, 用不完的试剂-20℃保存, 不可超过 7~10 天。

试剂五: 粉剂×1 支, -20℃保存。稀释液 1.2mL×1 支, -20℃保存。用时将每支稀释液吸到 1 支粉剂中, 混匀, 用不完的试剂-20℃保存, 不可超过 10 天。

试剂六: 谷氨酸标准品粉剂×1 支, 稀释液 10mL×1 瓶, 4℃保存。用时先将一支标准品粉剂加 5mL 稀释液加热(可煮沸)溶解, 配成 10mmol/L 谷氨酸标准贮备液。每次测试时取贮备液 10 μ L 加稀释液 0.49mL, 配成 200 μ mol/L 谷氨酸标准应用液。

三、操作步骤:

1、样本前处理:

①、**血清(浆)等液体样本:** 取 0.05mL 的血清(浆)加 0.15mL 的试剂一(按 1: 3 比例), 充分混匀, 3000~3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清待测。

②、**动物组织样本:** 准确称取组织重量,按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液待测即 10%的匀浆上清液(取部分上清液测蛋白浓度, 蛋白定量试剂盒本公司有售); 取 10%的匀浆上清液 0.05mL 加 0.15mL 的试剂一(按 1: 3 比例), 充分混匀, 3000~3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清待测。

③、**植物组织样本:** **方法一**是先将植物组织用 PBS 擦洗干净, 再用吸水纸吸干, 后剪碎放入研钵中, 液氮研磨成粉, 称取植物粉末, 按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的 PBS, 涡旋震荡(或研磨仪研磨) 1 分钟, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取匀浆上清液 0.2mL 加 0.6mL 的试剂一(按 1: 3 比例), 充分混匀, 3000~3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清待测; **方法二**是在洗净并擦干水分后, 直接称重, 按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的 PBS, 冰水浴条件下机械匀浆, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液 0.05mL 加 0.15mL 的试剂一(按 1:3 比例), 充分混匀, 3000~3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清 0.05mL 待测。(注: 一般水分含量较高

的植物用方法二来处理, 相反水分含量低或者干样推荐用方法一处理)

④、**细胞样本:** 收集细胞后, 每份细胞(细胞数量尽量不要低于 10⁶ 个, 越多越好)加入 0.3mL 的生理盐水(或者 PBS), 冰水浴下超声破碎(功率 200-300W, 运行 5 秒, 间隔 15 秒, 反复 3-5 次), 4000 转/分离心 10 分钟, 取上清液(上清液需要测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售) 0.05mL 加 0.15mL 的试剂一(按 1: 3 比例), 充分混匀, 3000~3500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清 0.05mL 待测。

四、操作步骤:

1、**配制工作液:** 按试剂二:试剂三:试剂四:双蒸水=100:10:1:39 的比例进行配制, 用多少配多少, 现配现用。

2、操作表:

	空白管	标准管	测定管
双蒸水 (μ L)	50		
200 μ mol/L 谷氨酸标准应用液 (μ L)		50	
待测上清液 (μ L)			50
工作液 (μ L)	150	150	150
轻轻震荡孔板混匀, 波长 340nm, 酶标仪读取吸光值 A ₁			
试剂五 (μ L)	4	4	4
轻轻震荡孔板混匀, 37℃孵育 40 分钟, 波长 340nm 处, 酶标仪读取吸光值 A ₂ , 计算 $\Delta A = A_2 - A_1$			

五、计算公式及举例:

1、血清(浆)等液体样本计算公式:

$$\text{谷氨酸浓度} (\mu\text{mol/L}) = \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 4$$

动物组织(或细胞)的计算公式:

$$\text{谷氨酸浓度} (\mu\text{mol/gprot}) = \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 4 \div C_{\text{pr}}$$

植物组织的计算公式:

$$\text{谷氨酸浓度} (\mu\text{mol/g组织}) = \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 4 \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

细胞样本的计算公式:

$$\text{谷氨酸浓度} (\mu\text{mol/万个细胞}) = \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 4 \div \frac{\text{细胞总数}}{V_{\text{样总}}}$$

以上公式中:

$C_{\text{标准}}$ 为标准品浓度, 200 μ mol/L;

4 为样本前处理(加试剂一)稀释倍数;

C_{pr} 为匀浆蛋白浓度, gprot/L (prot 指蛋白);

W 为组织重量, g;

$V_{\text{样总}}$: 样本匀浆时的匀浆液总体积(约等于加入的匀浆介质的总体积), L;

细胞总数: 收集好用于破碎的细胞的总数量, 万个。

附录：标准曲线制备（选做）

1、前处理：

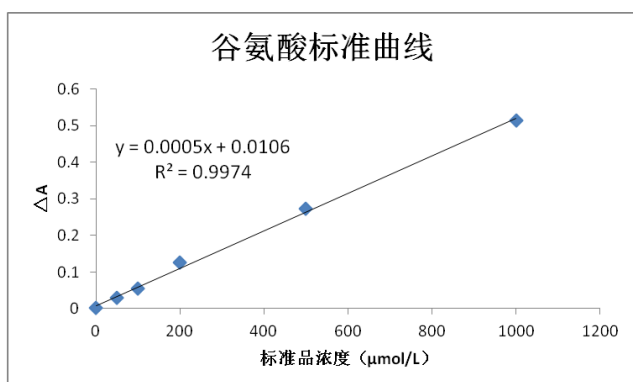
将 10mmol/L 谷氨酸标准贮备液用标准品稀释液稀释成不同的浓度：50、100、200、500、1000 μ mol/L 按操作表操作。

配制工作液：按试剂二:试剂三:试剂四:双蒸水 = 100:10:1:39 的比例进行配制，用多少配多少，现配现用。

2、操作表：

	空白管	标准管
双蒸水 (μ L)	50	
不同浓度的谷氨酸标准品 (μ L)		50
工作液 (μ L)	150	150
轻轻震荡孔板混匀，波长 340nm，酶标仪读取吸光值 A_1		
试剂五 (μ L)	4	4
轻轻震荡孔板混匀，37 $^{\circ}$ C 孵育 40 分钟，波长 340nm 处，酶标仪再次读取各孔吸光值 A_2 值，计算 $\Delta A = A_2 - A_1$		

3、测定结果：



（标准曲线可以不做，只需按第一页操作表操作后，代入计算公式计算即可。如果需要做标准曲线，则可将样本 ΔA 值代入标曲计算得到的值，替换公式中的

$\frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}}$ ，再继续运算，即可得最终结果）