

谷氨酸测试盒说明书

(货号: A074-1-1 50 管/48 样)

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、试剂盒组成与试剂配制: (试剂盒有效期 3 个月)

试剂一: 液体 40mL×1 瓶, 室温保存。

试剂二: 液体 60mL×1 瓶, 4℃避光保存。

试剂三: 粉剂×3 支, -20℃保存。稀释液 10mL×1 瓶, -20℃保存。用时每支粉剂加稀释液 2mL 配成应用液, 用不完的试剂-20℃保存, 不可超过 10 天。

试剂四: 粉剂×3 支, -20℃保存。稀释液 1mL×1 支, -20℃保存。用时每支粉剂加稀释液 0.2mL 配成应用液, 用不完的试剂-20℃保存, 不可超过 10 天。

试剂五: 粉剂×2 支, -20℃保存。稀释液 0.6mL×2 支, -20℃保存。用时将一支稀释液吸到一支粉剂中, 混匀配成应用液, 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×3 支, 稀释液 30mL×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 0.1mL 用稀释液(不需要加热)定容至 5mL, 配成 200 μ mol/L 谷氨酸标准应用液。

三、所需仪器及试剂:

紫外分光光度计及 1cm 光径石英比色皿, 涡旋混匀器, 37℃水浴锅, 离心机, 蒸馏水, 蛋白测定试剂(本公司有售)。

四、样本前处理:

①、**血清(浆)等液体样本:** 直接使用。

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, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液即 10% 的匀浆上清液待测(取部分上清液测蛋白浓度, 蛋白定量试剂盒本公司有售);

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 10^6 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, 取上清液待测(上清液需要测定其蛋白浓度, 蛋白测定试剂盒本公司有售)。

五、操作步骤:

1、先将样本(或经前处理取得的匀浆上清)按 1:3 的比例加试剂一混合(如取 0.2mL 样本加 0.6mL 试剂一), 充分混匀后, 4000 转/分离心 10 分钟, 取上清液按操作表操作;

2、操作表:(试剂二、试剂三应用液及试剂四应用液可按操作表加入比例及需要量预先混合好, 一次性加入反应, 但混合液须现用现配)

	空白管	标准管	测定管
200 μ mol/L 谷氨酸标准应用液(mL)		0.5	
上清液(mL)			0.5
试剂二(mL)	1.0	1.0	1.0
试剂三应用液(mL)	0.1	0.1	0.1
试剂四应用液(mL)	0.01	0.01	0.01
蒸馏水(mL)	0.89	0.39	0.39
混匀, 340nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 紫外分光光度计测各管吸光度 A_1 值			
试剂五应用液(mL)	0.02	0.02	0.02
混匀, 37℃水浴 40 分钟, 取出后再次于 340nm 处, 紫外分光光度计测各管吸光度 A_2 值, 计算 $\Delta A = A_2 - A_1$			

六、计算公式:

1、血清(浆)等液体样本计算公式:

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

组织样本按蛋白浓度计算公式:

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

组织样本按质量计算公式:

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

细胞样本按细胞数计算公式:

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

以上公式中:

$C_{\text{标准}}$ 为标准液浓度, 200 μ mol/L;

4 为样本加试剂一处理时的稀释比例;

C_{pr} 为匀浆蛋白浓度, g/L;

W 为组织重量, g;

$V_{\text{样总}}$ 为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;

细胞总数为细胞破碎时的细胞的总数量, 万个。

附录：标准曲线制作（选做）

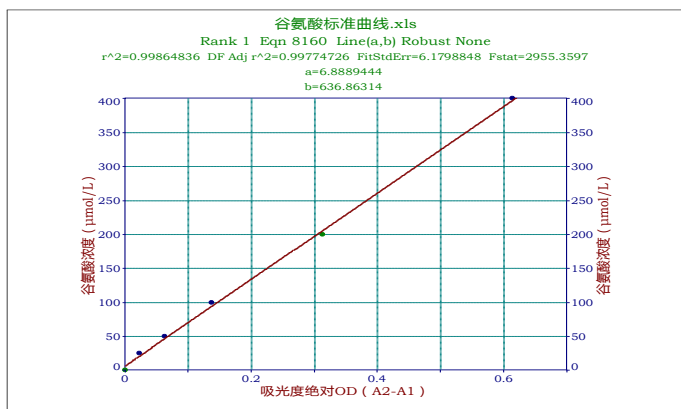
1、前处理：

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：25、50、100、200、400μmol/L 按操作表操作。

2、操作表：

	空白管	标准管
不同浓度的谷氨酸标准品 (mL)		0.50
试剂二(mL)	1.00	1.00
试剂三应用液(mL)	0.10	0.10
试剂四应用液(mL)	0.01	0.01
蒸馏水(mL)	0.89	0.39
混匀，340nm 处，1cm 光径，蒸馏水调零，紫外分光光度计测各管吸光度 A ₁ 值		
试剂五应用液(mL)	0.02	0.02
混匀，37℃水浴 40 分钟，取出后再次于 340nm 处，紫外分光光度计测各管吸光度 A ₂ 值,计算ΔA=A ₂ -A ₁		

3、测定结果：



(标准曲线用户如果不做,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ΔA_{测定}减去ΔA_{空白}后的值代入标曲计算,再将所得数值代替前面计算公式中的

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