



## 谷氨酸(Glu)含量检测试剂盒(WST 显色法)

中文名称：谷氨酸(Glu)含量检测试剂盒(WST 显色法)

英文名称：Glutamate(Glu)Content Assay Kit (WST colorimetry)

储存条件：-20℃

产品包装：盒装

检测方法：微量法

有效期：6个月

产品规格：100T/48S

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 85mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 1.5mL×1 支	2-8℃保存
试剂三	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂四	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂五	液体 4mL×1 瓶	2-8℃保存
标准液	液体 0.5mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

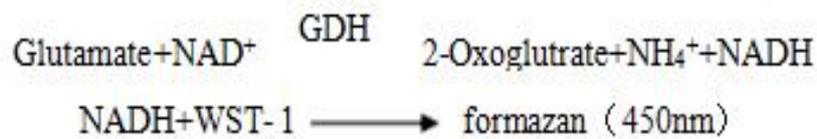
- 1、试剂三：临用前取 1 瓶加入 6mL 试剂一，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融。
- 2、试剂四：临用前取 1 支加入 0.5mL 试剂二，用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融。
- 3、标准液：10μmol/mL 谷氨酸标准品。

产品说明：



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。

谷氨酸脱氢酶(GDH) 催化谷氨酸和 NAD 生成 $\alpha$ -酮戊二酸、NADH 和  $\text{NH}_4^+$ ，在 1-mPMS 作用下，WST-1 可与 NADH 反应，产生水溶性 formazan，计算谷氨酸含量。



**注意：**实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验，如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

#### 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、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵/匀浆器/超声破碎仪、冰、蒸馏水。

#### 操作步骤：

##### 一、样本处理(可适当调整待测样本量)

细菌、细胞：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一，超声波破碎细菌或细胞(功率 200w，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)，10000g，常温离心 10min，取上清待测。

组织：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一，进行冰浴匀浆，10000g，常温离心 10min，取上清待测。

液体：直接测定。(若有浑浊则离心后取上清测定)



## 二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 450nm, 分光光度计蒸馏水调零。
2. 标准溶液的制备: 将标准品用蒸馏水分别稀释为 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.07813, 0.039, 0.0195, 0.01、0.005、0.0025 $\mu\text{mol/mL}$  的标准溶液。
3. 标准品稀释表:

序号	稀释前浓度( $\mu\text{mol/mL}$ )	标准液体积( $\mu\text{L}$ )	蒸馏水体积( $\mu\text{L}$ )	稀释后浓度( $\mu\text{mol/mL}$ )
1	10	50	750	0.625
2	0.625	200	200	0.3125
3	0.3125	200	200	0.15625
4	0.15625	200	200	0.07813
5	0.07813	200	200	0.039
6	0.039	200	200	0.0195
7	0.0195	200	200	0.01
8	0.01	200	200	0.005
9	0.005	200	200	0.0025

实验中每个标准管需 40 $\mu\text{L}$  标准溶液。

## 4. 操作表:

试剂( $\mu\text{L}$ )	测定管(A2)	对照管(A1)	标准管	空白管
标准品	-	-	40	-
蒸馏水	-	-	-	40
样品	40	40	-	-
试剂一	-	170	-	170
试剂三	160	-	160	-
试剂四	10	-	10	-
试剂五	30	30	30	30

混匀, 37°C 避光反应 30min。200 $\mu\text{L}$  至微量比色皿/96 孔板中, 在 450nm 下读取对照管吸光值 A1、测定管 A2。计算  $\Delta A = A2 - A1$ 。 $\Delta A$  标准 = A 标准 - A 空白管。(标准管和空白管只需做 1-2 次), 每个测定管需要设定一个对照管。

## 三、谷氨酸含量计算

### 1. 标准曲线的绘制:



根据标准管的浓度(x ,  $\mu\text{mol/mL}$ )和吸光度 $\Delta A$  标准(y ,  $\Delta A$  标准), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将 $\Delta A$  代入方程得到 x( $\mu\text{mol/mL}$ )。

## 2. 谷氨酸含量计算:

(1)按照蛋白浓度计算:

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{mol/mg prot})=x \times V_{\text{样本}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样本}}) = x \div \text{Cpr}$$

(2)按照样本质量计算:

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{mol/g 质量})=x \times V_{\text{样本}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样本}}) = x \div W$$

(3)按照细菌或细胞数量计算:

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{mol}/10^4\text{cell})=x \times V_{\text{样本}} \div (500 \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样本}}) = 0.002x$$

(4)按照液体体积计算:

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{mol/mL})=x \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{样本}} = x$$

$V_{\text{样总}}$ : 加入提取液体积, 1mL;  $V_{\text{样本}}$ : 加入的样本体积, 0.04mL; 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。

### 注意事项:

1、如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。

### 实验实例:

1、称取约 0.1g 鼠肺, 加入 1mL 试剂一, 冰浴研磨, 10000g, 常温离心 10min 取上清, 待测。之后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算  $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.449 - 0.384 = 0.065$ , 标准曲线  $y = 1.5338x + 0.0091$ , 根据标曲得出  $x = 0.036$ , 谷氨酸含量得:

$$\text{谷氨酸含量}(\mu\text{mol/g 质量}) = x \times V_{\text{样本}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样本}}) = x \div W = 0.36 \mu\text{mol/g}.$$

2、吸取 0.04 mL 羊血清, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得计算  $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.379 - 0.105 = 0.274$ , 标准曲



线  $y=1.5338x+0.0091$ , 根据标曲得出  $x=0.173$ , 谷氨酸含量得:

谷氨酸含量( $\mu\text{mol/mL}$ )= $x \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{样本}} = x = 0.173 \mu\text{mol/mL}$ 。