（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K118-S

产品规格：50 assays(46 samples)/100 assays(96 samples)

检测仪器：紫外-可见光分光光度计(340 nm)

Elabscience®谷氨酸比色法测试盒

Glutamic Acid Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100
邮箱：biochemical@elabscience.cn
网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。
联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清、血浆、动物组织、细胞及细胞上清中谷氨酸的含量。

检测原理

谷氨酸和 NAD^+在谷氨酸脱氢酶作用下产生α-酮戊二酸、NADH 和 NH_4^+，NADH 在 340 nm 处有最大吸收，通过测定 NADH 的变化，可计算谷氨酸的含量。

本试剂盒检测组织、细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 法蛋白测定试剂盒(货号：E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1) (50 Assays)	规格 2 (Size 2) (100 Assays)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	蛋白沉淀剂 (Protein Precipitator)	35 mL×1 瓶	35 mL×2 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	60 mL×1 瓶	60 mL×2 瓶	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂三 (Reagent 3)	显色剂 (Chromogenic Agent)	粉剂×2 瓶	粉剂×2 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂稀释液 (Chromogenic Agent Diluent)	8 mL×1 瓶	16 mL×1 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂五 (Reagent 5)	促进剂 (Accelerator)	粉剂×2 支	粉剂×2 支	-20°C 保存 3 个月
试剂六 (Reagent 6)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×2 支	粉剂×2 支	-20°C 保存 3 个月
试剂七 (Reagent 7)	酶稀释液 (Enzyme Diluent)	1.5 mL×1 支	1.5 mL×2 支	-20°C 保存 3 个月
试剂八 (Reagent 8)	标准品 (Standard)	粉剂×2 支	粉剂×2 支	-20°C 保存 3 个月
试剂九 (Reagent 9)	标准品稀释液 (Standard Diluent)	35 mL×1 瓶	35 mL×1 瓶	-20°C 保存 3 个月

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：恒温箱(37°C)，紫外-可见光分光光度计(检测波长为 340 nm)

试剂：双蒸水、生理盐水(0.9% NaCl)或 PBS(0.01 M，pH 7.4)

试剂准备

规格(50 Assays)试剂配制：

① 检测前试剂平衡至室温。

② 试剂三工作液配制：

每瓶粉剂加入3 mL的试剂四，充分溶解后使用，未用完部分-20°C保存7天。

③ 试剂五工作液配制：

每支粉剂加入0.3 mL双蒸水，充分溶解后使用，未用完部分-20°C保存7天。

④ 试剂六工作液配制：

每支粉剂加入0.6 mL的试剂七，充分溶解后使用，待用时需放置在冰盒上，未用完部分-20°C保存7天。

⑤ 10 mmol/L标准品储备液的配制：

每支试剂八用10 mL试剂九，在70-80°C水浴中加热溶解，冷却后用试剂九定容至10 mL待用，未用完部分2-8°C可保存7天。

⑥ 200 μmol/L标准品的配制：

取0.1 mL的10 mmol/L标准品储备液，用试剂九1: 49稀释，未用完部分2-8°C可保存7天。

⑦ 反应工作液的配制：

按试剂二：试剂三工作液：试剂五工作液：双蒸水=1: 0.1: 0.01: 0.39进行配制，现用现配，按需配制。

规格(100 Assays)试剂配制：

① 检测前试剂平衡至室温。

② 试剂三工作液配制：

每瓶粉剂加入6 mL的试剂四，充分溶解后使用，未用完部分-20°C保存7天。

③ 试剂五工作液配制：

每支粉剂加入0.6 mL双蒸水，充分溶解后使用，未用完部分-20°C保存7天。

④ 试剂六工作液配制：

每支粉剂加入1.2 mL的试剂七，充分溶解后使用，待用时需放置在冰盒上，未用完部分-20°C保存7天。

⑤ 10 mmol/L标准品储备液的配制：

每支试剂八用10 mL试剂九，在70-80°C水浴中加热溶解，冷却后用试剂九定容至10 mL待用，未用完部分2-8°C可保存7天。

⑥ 200 μmol/L标准品的配制：

取0.1 mL的10 mmol/L标准品储备液，用试剂九1: 49稀释，未用完部分2-8°C可保存7天。

⑦ 反应工作液的配制：

按试剂二：试剂三工作液：试剂五工作液：双蒸水=1: 0.1: 0.01: 0.39进行配制，现用现配，按需配制。

样本准备

① 样本处理

组织样本：取 0.1-1 g 新鲜组织块，用 2-8°C 的生理盐水(0.9%，NaCl)漂洗，去除血液，滤纸吸干，称重，放入匀浆容器中，按照重量(g)：体积(mL)= 1: 9 的比例加入生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS(0.01 M，pH 7.4)，进行匀浆，4°C，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

细胞样本：按照 10^6 个细胞加入 300 μL 匀浆介质的比例加入生理盐水（0.9% NaCl）或 PBS(0.01 M，pH 7.4)，进行机械匀浆，充分破碎(无明显的细胞沉淀，可在显微镜下观察)，4°C，10000 × g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：4.00-450 μmol/L，可参考下表进行稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	不稀释	10%大鼠肾脏组织	不稀释
小鼠血清	不稀释	10%大鼠脑组织	不稀释
10%大鼠肝脏组织	不稀释		

注：稀释液为 PBS(0.01 M，pH 7.4)或生理盐水(0.9% NaCl)。

实验关键点

① 粉剂溶解后保存时间较短，请及时使用。

② 试剂六粉剂溶解后，使用时请放置在冰盒上。

③ 样本管测定每次不超过 16 个。

操作步骤

样本前处理

血清(浆)、细胞上清样本：

取 0.2 mL 的样本于 2 mL EP 管中，加入 0.6 mL 试剂一(比例为 1: 3)，充分混匀后，3100 × g，离心 10 min，取 0.5 mL 上清待测。

组织、细胞样本：

按照常规方式得到组织或细胞样本匀浆后，取其 0.2 mL 于 2 mL EP 管中，加入 0.6 mL 试剂一(比例为 1: 3)，充分混匀后，3100 × g，离心 10 min，取 0.5 mL 上清待测。

实验操作

① 空白管：取 0.5 mL 双蒸水加到空白管中；
标准管：取 0.5 mL 200 μmol/L 标准品加入到标准管中。
测定管：取 0.5 mL 样本上清加入到测定管中。

② 步骤①中的各管加 1.5 mL 反应工作液，涡旋混匀 3 s。

③ 340 nm 处，1 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零，测各管 OD 值 A_1。

④ 测定后倒回原管，向各管加入 0.02 mL 试剂六工作液，涡旋混匀 3 s。

⑤ 37°C 孵育 40 min。

⑥ 于 340 nm 处，1 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零，测各管 OD 值 A_2。

操作表

	空白管	标准管	测定管
双蒸水(mL)	0.5	--	--
200 μM 标准品(mL)	--	0.5	--
待测上清(mL)	--	--	0.5
反应工作液(mL)	1.5	1.5	1.5
涡旋混匀 3 s，340 nm 处，1 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零，测各管 OD 值 A_1			
试剂六工作液(mL)	0.02	0.02	0.02
涡旋混匀 3 s，37°C 孵育 40 min，于 340 nm 处，1 cm 光径石英比色皿，双蒸水调零，测各管 OD 值 A_2			

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

结果计算

组织、细胞样本中谷氨酸含量计算公式：

$$\text{谷氨酸含量}(\mu mol/gprot) = \frac{(\text{测定}A_2 - \text{测定}A_1)-(\text{空白}A_2 - \text{空白}A_1)}{(\text{标准}A_2 - \text{标准}A_1)-(\text{空白}A_2 - \text{空白}A_1)} \times c \times 4^* \times f \div C_{pr}$$

血清、血浆样本中谷氨酸含量计算公式：

$$\text{谷氨酸含量}(\mu mol/L) = \frac{(\text{测定}A_2 - \text{测定}A_1)-(\text{空白}A_2 - \text{空白}A_1)}{(\text{标准}A_2 - \text{标准}A_1)-(\text{空白}A_2 - \text{空白}A_1)} \times c \times 4^* \times f$$

注解：

c：标准品的浓度为 200 μmol/L

4*：待测上清制备过程中被稀释 4 倍

f：样本制备上清液前的稀释倍数

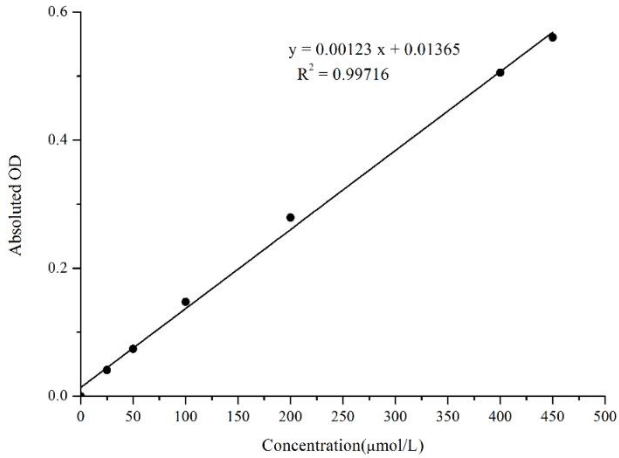
C_{pr}：待测样本的蛋白浓度(gprot/L)

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	4.00-450 μmol/L	**平均批间差**	2.9 %
灵敏度	4.00 μmol/L	**平均批内差**	2.2 %
平均回收率	104 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)



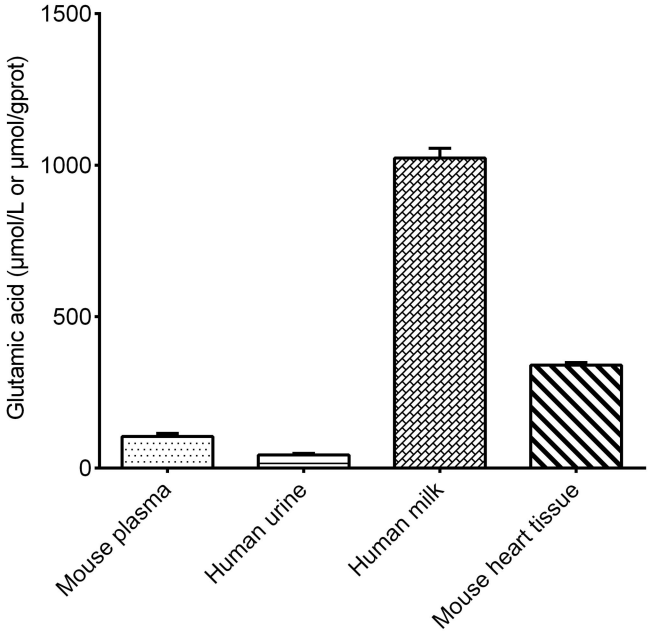
附录2 实例分析

例如检测小鼠血浆(数据仅供参考):

取0.2 mL小鼠血浆,按照操作表检测,结果如下:测定管平均A_1值为0.047,测定管平均A_2值为0.105，空白管平均A_1值为0.038，空白管平均A_2值为0.060,标准管平均A_1值为0.070，标准管平均A_2值为0.339，计算结果为:

$$\text{谷氨酸含量 (μmol/L)} = \frac{(0.105 - 0.047) - (0.060 - 0.038)}{(0.339 - 0.070) - (0.060 - 0.038)} \times 200 \times 4 = 116.60\ \text{μmol/L}$$

按照操作过程，测定小鼠血浆(加样量0.2 mL)、人尿液(加样量0.2 mL)、人乳汁(加样量0.2 mL)和小鼠心脏组织(10%组织的蛋白含量3.76 gprot/L,加样量0.2 mL)中含量(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	试剂六工作液加入不准确	加入试剂五时,注意不要沾到管壁上
样本、标准品 OD 值低	孵育时间太短	保证充足的静置时间
	粉剂溶解后保存时间过长	重新溶解粉剂
样本测不出值	样本稀释倍数太大	选择合适的稀释倍数,重新检测
	样本保存时间过长或保存不当	取新鲜样本，重新检测
样本测量结果＞450 μmol/L	样本浓度太高	选择合适的稀释倍数,重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Tseng S.Ja. An acid degradable, lactate oxidizing nanoparticle formulation for non-small cell lung cancer virotherapy[J]. Nano Today. IF:18.962
2. Salman T M, Iyanda M A, Alli-Oluwafuyi A M, et al. Telfairia occidentalis stimulates hepatic glycolysis and pyruvate production via insulin-dependent and insulin-independent mechanisms[J]. Metabolism Open, 2021, 10(1-10):100092. IF:8.694
3. Zhang Y, Wang Z, Shi B, et al. Effect of gingival mesenchymal stem cell-derived exosomes on inflammatory macrophages in a high-lipid microenvironment[J]. International Immunopharmacology, 2021, 94(9499):107455. IF:4.932
4. Alsayyah A, ElMazoudy R, Al-Namshan M, et al. Chronic neurodegeneration by aflatoxin B1 depends on alterations of brain enzyme activity and immunoexpression of astrocyte in male rats[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2019, 182: 109407. IF:4.527
5. Faheem M. Synthesis and Biological Evaluation of Benzimidazole Derivatives as Potential Neuroprotective Agents in an Ethanol-Induced Rodent Model[J]. ACS Chemical Neuroscience, 2021, 12(3):489−505. IF:4.418
6. Ren F , Xu X , Xu J B , et al. Compound essential oils relieve oxidative stress caused by PM 2. 5 exposure by inhibiting autophagy through the AMPK / mTOR pathway[J]. Environmental Toxicology, 2021 Sep; 36(9):1765-1774. IF:4.119
7. Mohsin Alvi A, Tariq Al Kury L, Umar Ijaz M, et al. Post-Treatment of Synthetic Polyphenolic 1, 3, 4 Oxadiazole Compound A3, Attenuated Ischemic Stroke-Induced Neuroinflammation and Neurodegeneration[J]. Biomolecules, 2020, 10(6): 816. IF:4.082
8. Darband S G, Sadighparvar S, Yousefi B, et al. Quercetin attenuated oxidative DNA damage through NRF2 signaling pathway in rats with DMH induced colon carcinogenesis[J]. Life sciences, 2020(253-). IF:3.708
9. Shah F A, Ali T, Khan A U. Potent Natural Antioxidant Carveol Attenuates MCAO-induced Oxidative stress, Neurodegeneration by Regulating the Nrf-2 pathway[J]. Frontiers in Neuroscience, 2020, 14: 659. IF:3.707
10. Amany Abdel-Rahman Mohamed , Safaa I. Khater , Ahmed Hamed Arisha , et al. Chitosan-stabilized selenium nanoparticles alleviate cardio-hepatic damage in type 2 diabetes mellitus model via regulation of caspase, Bax/Bcl-2, and Fas/FasL-pathway[J]. Gene, 2020, 768(7):145288. IF:3.688