

氨基酸(amino acid, AA)含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-AJS005-1000 微板法 1000 样)

一、产品简介:

氨基酸是组成蛋白质的基本单位,也是蛋白质分解产物的种类之一。游离氨基酸与果蔬品质,采后生理,氮素代谢等有密切的关系。也能反映动物肝脏、肾脏的生理状态。

本试剂盒采用茚三酮显色法测定氨基酸:在酸性条件下,氨基酸与茚三酮共热能产生蓝紫色化合物二酮茚胺,经光谱扫描在 570 nm 有特征吸收峰;通过测定 570 nm 吸光度,来计算氨基酸含量。

二、测试盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	临用前每 1ml 加 9ml 蒸馏水稀释
试剂一	液体 80mL×1 瓶	4℃保存	临用前,用蒸馏水定容至 6L
试剂二	粉剂 9 瓶	4℃保存	临用前每瓶加入 7.5mL 无水乙醇,盖紧后充分混匀,再加入 67.5mL 配置好的试剂一混匀制备成反应 mix,10 天内用完。
试剂三	粉剂 3 瓶	4℃保存	用前甩几下或 4℃离心使试剂落入试管底部,每瓶再加 15mL 蒸馏水充分溶解,用不完的试剂分装后-20℃保存(可保存一个月),禁止反复冻融,解冻后可 4℃保存并一周内使用完。
标准品	液体 7.5mL×2 瓶	4℃保存	若重新做标曲,则用到该试剂。

[注]:粉剂量在 mg 级别,使用前用手甩几次或者进行离心,打开直接加入要求的试剂即可。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液枪、研钵、无水乙醇、冰和蒸馏水。

四、氨基酸(AA)含量的测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织(水分充足的样本可取 0.2g 组织),加入 1mL 提取液,进行室温匀浆,12000rpm,4℃离心 10min,上清液置冰上待测。

[注]:也可按照组织质量(g)提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取。

② 细菌或细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液,进行室温匀浆,12000rpm,4℃离心 10min,上清液置冰上待测。

[注]:也可按照细菌或细胞数量(10⁴个):提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例提取。

③ 液体样本:直接检测。若浑浊,离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30 min,调节波长到 570 nm。

② 在 EP 管中按照下表依次加入试剂:

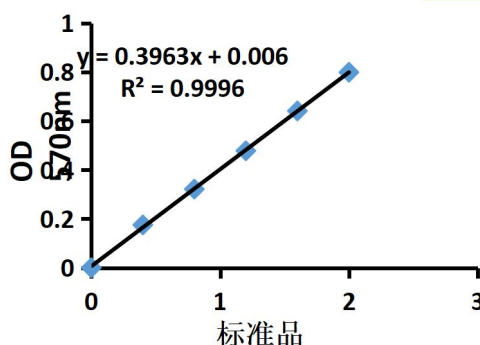
试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (只做一次)
蒸馏水		40
上清液	40	
反应 mix	560	560

试剂三	40	40
混匀，盖紧盖（可用封口膜缠绕，防止水分散失），置沸水浴中 15 min，取出后冷却至室温并摇晃混匀约 1min。		
95%乙醇	320	320
混匀，取 200μL 澄清液体（若浑浊可 8000rpm 室温离心 5min）于 96 孔板中，在 570nm 读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

【注】若 A 测定值大于 1.5，可用蒸馏水把上清液稀释后再按照加样表重新测定，则稀释倍数 D 代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.3963x + 0.006$ ；x 是标准品摩尔浓度(μmol/mL)，y 是 ΔA 。



2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{氨基酸含量}(\mu\text{mol/g 重量}) &= [(\Delta A - 0.006) \div 0.3963 \times V1] \div (V1 \div V \times W) \times D \\ &= 2.52 \times (\Delta A - 0.006) \div W \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{氨基酸含量}(\mu\text{g/g 重量}) &= [(\Delta A - 0.006) \div 0.3963 \times V1] \div (V1 \div V \times W) \times D \times Mr \\ &= 330.6 \times (\Delta A - 0.006) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{氨基酸含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.006) \div 0.3963 \times V1] \div (V1 \div V \times \text{细胞数量}) \times D \\ &= 2.52 \times (\Delta A - 0.006) \div \text{细胞数量} \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{氨基酸含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.006) \div 0.3963 \times V1] \div (V1 \div V \times \text{细胞数量}) \times D \times Mr \\ &= 330.6 \times (\Delta A - 0.006) \div \text{细胞数量} \times D \end{aligned}$$

4、按照液体体积计算：

$$\text{氨基酸含量}(\mu\text{mol/mL}) = [(\Delta A - 0.006) \div 0.3963 \times V1] \div V1 \times D = 2.52 \times (\Delta A - 0.006) \times D$$

$$\begin{aligned} \text{氨基酸含量}(\mu\text{g/mL}) &= [(\Delta A - 0.006) \div 0.3963 \times V1] \div V1 \times D = 2.52 \times (\Delta A - 0.006) \times D \times Mr \\ &= 330.6 \times (\Delta A - 0.006) \times D \end{aligned}$$

V---样品提取液总体积，1mL；

V1---加入样本体积，0.04 mL；

W---样品质量，g；

Mr---标准品分子量，131.174；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标准品母液（10μmol/mL）；
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 μmol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。