

氨基酸(amino acid, AA)含量测定试剂盒说明书

(货号: BP10364W-1000 微板法 1000 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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、试剂组和制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃ 保存	1. 临用前每 1ml 加 9ml 蒸馏水稀释; 2. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂一	液体 80mL×9 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 9 瓶	4℃ 保存	每瓶: 1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 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	每瓶: 1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 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	1. 若重新做标曲,则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

测盒成配

[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、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、无水乙醇、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验,熟悉操作流程,根据预实验结果确定或调整样本浓度,以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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、检测步骤：

① 酶标仪预热 30 min，调节波长到 570 nm。

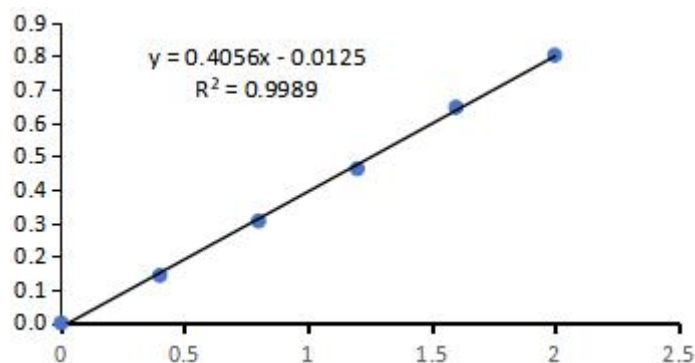
② 在 EP 管中按照下表依次加入试剂：

试剂组分（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： $y = 0.4056x - 0.0125$ ；x 是标准品摩尔浓度(μmol/mL)，y 是 ΔA 。



2、按样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{氨基酸含量}(\mu\text{mol/g 重量}) &= [(\Delta A + 0.0125) \div 0.4056 \times V_1] \div (V_1 \div V \times W) \times D \\ &= 2.47 \times (\Delta A + 0.0125) \div W \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{氨基酸含量}(\mu\text{g/g 重量}) &= [(\Delta A + 0.0125) \div 0.4056 \times V_1] \div (V_1 \div V \times W) \times D \times Mr \\ &= 323.4 \times (\Delta A + 0.0125) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{氨基酸含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0125) \div 0.4056 \times V_1] \div (V_1 \div V \times \text{细胞数量}) \times D \\ &= 2.47 \times (\Delta A + 0.0125) \div \text{细胞数量} \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{氨基酸含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0125) \div 0.4056 \times V_1] \div (V_1 \div V \times \text{细胞数量}) \times D \times Mr \\ &= 323.4 \times (\Delta A + 0.0125) \div \text{细胞数量} \times D \end{aligned}$$

4、按照液体体积计算：

$$\text{氨基酸含量}(\mu\text{mol/mL}) = [(\Delta A + 0.0125) \div 0.4056 \times V_1] \div V_1 \times D = 2.47 \times (\Delta A + 0.0125) \times D$$

$$\begin{aligned} \text{氨基酸含量}(\mu\text{g/mL}) &= [(\Delta A + 0.0125) \div 0.4056 \times V_1] \div V_1 \times D = 2.47 \times (\Delta A + 0.0125) \times D \times Mr \\ &= 323.4 \times (\Delta A + 0.0125) \times D \end{aligned}$$

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 标准品母液浓度为 10 μ mol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 200 μ L，加入 1800 μ L 蒸馏水，混匀得到 1 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 μ L	0	40	80	120	160	200
水 μ L	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	40	
蒸馏水		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 200 μ L 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， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		