

氨基酸(amino acid, AA)含量测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

动物肝脏、肾脏是氨基酸代谢的主要器官，故尿中氨基酸的变化最能反应肝、肾的生理状态。另外，氨基酸还能反应灼伤、伤寒等方面情况。植物体内氨基酸含量对研究植物在不同条件下及不同生长发育时期氮代谢变化、植物对氮素的吸收、运输、同化及营养状况等有重要意义。

测定原理：

氨基酸的 α -氨基可与水合茚三酮反应，产生蓝紫色化合物，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。

自备仪器及用品：

台式离心机、水浴锅、紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板、可调式移液枪、研钵、无水乙醇、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

试剂一：液体×1 瓶，4℃ 保存。

试剂二：液体×1 瓶，4℃ 保存。

试剂三：粉剂×1 瓶（棕色），4℃ 避光保存。临用前加入 667 μ L 无水乙醇，盖紧后充分混匀，再加入 9.333 mL 蒸馏水混匀，避光保存。

试剂四：粉剂×1 管，4℃ 避光保存。临用前加 1 mL 蒸馏水，充分溶解。

标准品：粉剂×1 瓶，临用前加 10 mL 蒸馏水，充分溶解。1 μ mol/mL 标准液，4℃ 避光保存。

样品中 AA 提取：

1. 按照组织质量 (g)：试剂一体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行室温匀浆，然后转移到 1.5 mL EP 管中，盖紧后（防止水分散失）置于沸水浴提取 15 min；自来水冷却后，8000g，4℃ 离心 10min，上清液置冰上待测。
2. 细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：试剂一体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。
3. 血清等液体：直接检测。

测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min，调节波长到 570 nm，蒸馏水调零。
2. **空白管**：取 EP 管，加入 10 μ L 蒸馏水，100 μ L 试剂二，100 μ L 试剂三和 10 μ L 试剂四，混匀后盖紧瓶盖（防止水分散失），置于沸水浴中保温 15 min，冷却后反复颠倒 EP 管数次，于 570nm 测定吸光值，记为 A 空白管。显色后务必在 30min 内测完。
3. **标准管**：取 EP 管，加入 10 μ L 标准品，100 μ L 试剂二，100 μ L 试剂三和 10 μ L 试剂四，混匀后盖紧瓶盖（防止水分散失），置于沸水浴中保温 15 min，冷却后反复颠倒 EP 管数次，于 570nm 测定吸光值，记为 A 标准管。显色后务必在 30min 内测完。
4. **测定管**：取 EP 管，加入 10 μ L 上清液，100 μ L 试剂二，100 μ L 试剂三和 10 μ L 试剂四，混匀后盖紧瓶盖（防止水分散失），置于沸水浴中保温 15 min，冷却后反复颠倒 EP 管数次，

于 570nm 测定吸光值，记为 A 测定管。显色后务必在 30min 内测完。

注意：空白管和标准管只需要测定一次。

氨基酸含量计算公式：

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{氨基酸含量}(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) &= [\text{C 标准品} \times \text{V 标准品} \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白})] \div \\ &(\text{V 样} \times \text{Cpr}) \\ &= 1 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{氨基酸含量}(\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}) &= [\text{C 标准品} \times \text{V 标准品} \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白})] \div \\ &(\text{V 样总} \div \text{V 样}) \div \text{W} \\ &= 1 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W}\end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

$$\begin{aligned}\text{氨基酸含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [\text{C 标准品} \times \text{V 标准品} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A} \\ &\text{空白管})] \times (\text{V 样总} \div \text{V 样} \times \text{细胞数量}) \\ &= 1 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

(4) 按照液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{氨基酸含量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) &= [\text{C 标准品} \times \text{V 标准品} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白} \\ &\text{管})] \div \text{V 样} \\ &= 1 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})\end{aligned}$$

C 标准品：标准品浓度，1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ；V 标准品：反应体系中加入标准品体积，0.01 mL；W：样品质量，g；V 样：反应体系中加入样品提取液体积，0.01 mL；V 样总：样品提取液总体积，1mL；；Cpr：上清液蛋白质浓度，mg/mL。

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下

(1) 按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{氨基酸含量}(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) &= [\text{C 标准品} \times \text{V 标准品} \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白})] \div \\ &(\text{V 样} \times \text{Cpr}) \\ &= 1 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{氨基酸含量}(\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}) &= [\text{C 标准品} \times \text{V 标准品} \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白})] \times \\ &(\text{V 样总} \div \text{V 样}) \div \text{W} \\ &= 1 \times (\text{A 测定} - \text{A 空白}) \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div \text{W}\end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

$$\begin{aligned}\text{氨基酸含量}(\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= [\text{C 标准品} \times \text{V 标准品} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A} \\ &\text{空白管})] \times (\text{V 样总} \div \text{V 样} \times \text{细胞数量}) \\ &= 1 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

(4) 按照液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{氨基酸含量}(\mu\text{mol}/\text{mL}) &= [\text{C 标准品} \times \text{V 标准品} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白} \\ &\text{管})] \div \text{V 样} \\ &= 1 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})\end{aligned}$$

C 标准品: 标准品浓度, $1 \mu\text{mol/mL}$; V 标准品: 反应体系中加入标准品体积, 0.01 mL ; W: 样品质量, g; V 样: 反应体系中加入样品提取液体积, 0.01 mL ; V 样总: 样品提取液总体积, 1 mL ; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL 。

注意事项:

1. 试剂盒中试剂三、试剂四和标准品均需临用前配制, 且避光保存, 配制好未使用完的 4°C 保存且 3 天内使用完毕。
2. 为保证实验结果的准确性, 需先取 1-2 个样做预实验, 如果测定的吸光值过高 (高于 2.5), 用蒸馏水稀释后再测定。
3. 脯氨酸和羟脯氨酸与茚三酮反应在 570 nm 处无吸收峰, 因此, 570 nm 处测定结果不含这两种氨基酸的量。
4. 最低检出限为 $100 \mu\text{mol/L}$ 。