

氨基酸(AA)含量检测试剂盒说明书

Amino Acid Content Assay Kit

微量法

货号: AK051

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK051-A	100mL×1 瓶	4℃保存
AK051-B	10mL×1 瓶	4℃保存
AK051-C	粉剂×1 瓶	4℃避光保存; 临用前加入 667μL 无水乙醇, 盖紧后充分混匀, 再加入 9.333 mL 蒸馏水混匀。
AK051-D	粉剂×1 管	4℃避光保存; 临用前加 1 mL 蒸馏水, 充分溶解, 用不完的试剂-20℃分装保存 2 周。
AK051-标准品	粉剂×1 支	4℃避光保存; 临用前加入 4.13 mL 蒸馏水, 得到 20 μmol/mL 的标准溶液备用, 用不完的试剂可以 4℃保存 1 个月。

简介:

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。此试剂盒用于测定生物样品中 L-氨基酸的含量。

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 570nm 有特征吸收峰; 通过测定 570nm 吸光度, 来计算氨基酸含量。

需自备的仪器和耗材:

天平、低温离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、水浴锅、可调式移液器、研钵、无水乙醇、冰和蒸馏水。

样品处理:

- 按照组织质量 (g): AK051-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK051-A) 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。
- 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): AK051-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL AK051-A), 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。
- 血清等液体: 吸取 0.5mL 液体加入 0.5mL AK051-A, 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, 取上清液, 置冰上待测。

测定步骤: (取 1.5ml 离心管, 按照下表操作)

- 分光光度计/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 570 nm, 蒸馏水调零。
- 标准品稀释: 取适量 20 μmol/mL 标准液加入蒸馏水稀释得到 5 μmol/mL 标准溶液进行实验。

3. 按下表进行操作:

试剂名称	空白管 (ul)	标准管 (ul)	测定管 (ul)
蒸馏水	10		
标准品		10	
上清液			10
AK051-B	100	100	100
AK051-C	100	100	100
AK051-D	10	10	10

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，8000rpm 离心 5min 后取上清，于 570nm 测定吸光值，分别记为 A 测定管、A 标准管、A 空白管，并计算 ΔA 测定管=A 测定管-A 空白管， ΔA 标准管=A 标准管-A 空白管；显色后务必在 30min 内测完。

注：标准管、空白管只需做 1-2 次。

氨基酸含量计算公式：

(1) 按蛋白浓度计算

氨基酸含量 ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$) = $[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白})] \div (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) = 5 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div C_{\text{pr}}$

(2) 按样本质量计算

氨基酸含量 ($\mu\text{mol}/\text{g}$) = $[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白})] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) = 5 \times (A \text{ 测定} - A \text{ 空白}) \div (A \text{ 标准} - A \text{ 空白}) \div W$

(3) 按细菌或细胞数量计算

氨基酸含量 ($\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}$) = $[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times 500) = 0.01 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$

(4) 按照液体体积计算

氨基酸含量 ($\mu\text{mol}/\text{mL}$) = $[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \div V \text{ 样} \times 2 = 10 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$

注： C 标准品：标准品浓度， $5 \mu\text{mol}/\text{mL}$ ；V 标准品：反应体系中加入标准品体积，0.01mL；W：样品质量，g；V 样：反应体系中加入样品提取液体积，0.01mL；V 样总：样品提取液总体积，1mL；C_{pr}：上清液蛋白质浓度，mg/mL；500：细菌或细胞总数，500 万个；2：提取液体时的稀释倍数。

注意事项：

1. 脯氨酸和羟脯氨酸与茚三酮反应在 570nm 处无吸收峰，因此 570nm 处测定结果不含这两种氨基酸的量。
2. 因提取过程中会使蛋白变性，若使用蛋白浓度计算时需用 PBS 或生理盐水单独提取后再测定。