

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、酶标仪、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 60 mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×1 瓶（棕色），4℃避光保存。临用前加入 1.667 mL 无水乙醇，盖紧后充分混匀，再加入 23.333 mL 试剂一混匀，避光保存。

试剂三：粉剂×1 管，4℃避光保存。临用前加 2.5mL 试剂一，充分溶解。

样品中 AA 提取：

1. 按照组织质量（g）：蒸馏水体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 蒸馏水）进行室温匀浆，置于沸水浴提取 15 min，取出冷却至室温后，8000g，25℃离心 10min，取上清待测。
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）：蒸馏水体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 蒸馏水），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）；置于沸水浴提取 15 min，取出冷却至室温后，8000g，25℃离心 10min，取上清待测。
3. 血清等液体：取 100 μ L 转移到 1.5 mL EP 管中，加入 900 μ L 蒸馏水，盖紧后（防止水分散失）置于沸水浴提取 15 min，取出冷却至室温后，8000g，25℃离心 10min，冷却至室温后待测。

测定操作：

1. 酶标仪预热 30 min，调节波长到 570 nm。
2. 取 EP 管，加入 20 μ L 待测液，200 μ L 试剂一，200 μ L 试剂二和 20 μ L 试剂三，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。

氨基酸含量计算公式：

使用 96 孔板测定的计算公式如下

$$\text{标准曲线: } y = 0.0027x + 0.0737 \quad R^2 = 0.9994 \quad \begin{array}{l} x: \text{亮氨酸标准品浓度 (}\mu\text{g/mL)} \\ y: \text{吸光值 A} \end{array}$$

(1) 按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned}\text{氨基酸含量} (\mu\text{g}/\text{mg prot}) &= 370.4 \times (\text{A 测定} - 0.0737) \times V_{\text{样}} \times (V_{\text{样总}} \div V_{\text{样}}) \div \text{Cpr} \\ &= 370.4 \times (\text{A 测定} - 0.0737) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

$$\begin{aligned}\text{氨基酸含量} (\mu\text{g}/\text{g 鲜重}) &= 370.4 \times (\text{A 测定} - 0.0737) \times V_{\text{样}} \times (V_{\text{样总}} \div V_{\text{样}}) \div W \\ &= 370.4 \times (\text{A 测定} - 0.0737) \div W\end{aligned}$$

(3) 按细胞数量计算

$$\begin{aligned}\text{氨基酸含量} (\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= 370.4 \times (\text{A 测定} - 0.0737) \times V_{\text{样}} \times (V_{\text{样总}} \div V_{\text{样}}) \div \text{细胞数量} \\ &= 370.4 \times (\text{A 测定} - 0.0737) \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

(4) 按照液体体积计算

$$\begin{aligned}\text{氨基酸含量} (\mu\text{g}/\text{mL}) &= 370.4 \times (\text{A 测定} - 0.0737) \times 10 \\ &= 3704 \times (\text{A 测定} - 0.0737)\end{aligned}$$

W: 样品质量, g; V 样: 反应体系中加入样品提取液体积, 0.02 mL; V 样总: 样品提取液总体积, 1mL; Cpr: 上清液蛋白质浓度, mg/mL。

注意事项:

1. 试剂盒中试剂二、试剂三均需临用前配制, 且避光保存, 配制好未使用完的 4℃ 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) 或者检测时吸光值下降很快, 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 570nm 处无吸收峰, 因此, 570nm 处测定结果不含这两种氨基酸的量。