

## 氨基酸(amino acid, AA)含量测定试剂盒说明书

(微板法 96 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°C保存	
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂×4 瓶	4°C保存	临用前每瓶加入 1.5mL 无水乙醇，盖紧后充分混匀，再加入 13.5mL 试剂一混匀制备成 <b>反应 mix</b> ，10 天内用完。
试剂三	粉剂×3 支	4°C保存	用前甩几下或 4°C离心使试剂落入试管底部，每支再加 1.5 mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂分装后-20°C保存(可保存一个月)，禁止反复冻融，解冻后可 4°C保存并一周内使用完。
标准品	液体 1.5mL×1 支	4°C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°C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°C离心 10min，上清液置冰上待测。

[注]：也可按照细菌或细胞数量（10<sup>4</sup> 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：

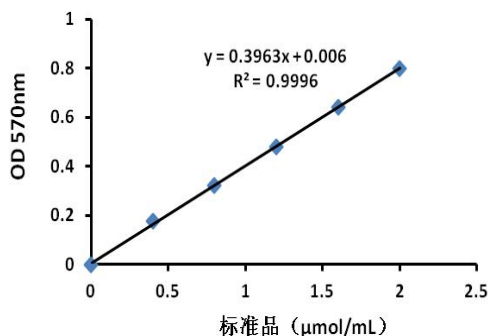
试剂名称（ $\mu$ L）	测定管	空白管（只做一次）
蒸馏水		40
上清液	40	
<b>反应 mix</b>	560	560
试剂三	40	40

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 $\mu$ 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-A 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( $\mu\text{mol/mL}$ )，y 是 $\Delta A$ 。



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（10 $\mu\text{mol/mL}$ ）；

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 $\mu\text{mol/mL}$ 。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。