

氨基酸（AA）含量检测试剂盒说明书

微量法

货号: BC1575

规格: 100T/96S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 100 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	液体 20 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	粉剂×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	粉剂×1 支	2-8°C保存
标准品	粉剂×1 支	2-8°C保存

溶液的配制:

- 1、试剂三: 临用前加入 1.33 mL 无水乙醇, 盖紧后充分混匀, 再加入 18.67 mL 蒸馏水混匀, 避光保存。
- 2、试剂四: 临用前加 2 mL 蒸馏水, 充分溶解。
- 3、标准品: 10 mg 半胱氨酸, 临用前加入 8.26 mL 蒸馏水, 得到 10 $\mu\text{mol/mL}$ 的半胱氨酸标准溶液备用。

产品说明:

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。

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。

技术指标:

最低检出限: 0.45 $\mu\text{mol/mL}$

线性范围: 0.5-18 $\mu\text{mol/mL}$

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品:

台式离心机、可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、无水乙醇、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

组织样本: 称取约 0.1g 组织, 加试剂一 1mL, 室温下充分研磨, 转移到 1.5mL EP 管中, 盖紧后 (防止水分散失) 置于沸水浴提取 15min; 自来水冷却后, 10000rpm, 4°C离心 10min, 取上清液, 待测。

细菌或细胞样本：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；10000rpm，4℃离心 10min，取上清液，待测。

液体：吸取 0.5mL 液体加入 0.5mL 试剂一，盖紧后（防止水分散失）置于沸水浴提取 15 min；自来水冷却后，10000rpm，4℃离心 10min，取上清液，待测。

二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 570nm，蒸馏水调零。

2. 操作表：（在 EP 管中进行）

试剂名称 (μL)	测定管	标准管	空白管
样本	10	-	-
标准品	-	10	-
蒸馏水	-	-	10
试剂二	100	100	100
试剂三	100	100	100
试剂四	10	10	10

混匀后盖紧瓶盖（防止水分散失），置于沸水浴中保温 15min，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。

三、氨基酸含量计算

1. 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{氨基酸含量} (\mu\text{mol/g 质量}) &= (\text{C标准品} \times \text{V标准品} \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}}) \div (\text{W} \div \text{V样总} \times \text{V样}) \\ &= 10 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div \text{W} \end{aligned}$$

2. 按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{氨基酸含量} (\mu\text{mol/mg prot}) &= (\text{C标准品} \times \text{V标准品} \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}}) \div (\text{Cpr} \times \text{V样}) \\ &= 10 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3. 按细菌或细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{氨基酸含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{C标准品} \times \text{V标准品} \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}}) \div (500 \times \text{V样} \div \text{V样总}) \\ &= 0.02 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \end{aligned}$$

4. 按液体体积计算

$$\text{氨基酸含量} (\mu\text{mol/mL}) = (\text{C标准品} \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}}) \times 2 = 20 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}}$$

C标准品：标准品浓度，10μmol/mL；V标准品：反应体系中加入标准品体积，0.01mL；W：样本质量，g；V样：反应体系中加入样本体积，0.01mL；V样总：样本总体积，1mL；Cpr：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，(V液体+V试剂一)/V液体=2。

注意事项：

- 1、试剂盒中试剂三和试剂四均需临用前配制，且避光保存。
- 2、为保证实验结果的准确性，需先取 1-2 个样做预实验。

- 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。
- 4、如果样本吸光值大于 0.78，建议将样本用试剂一稀释后进行测定。
- 5、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 单独提取后再测定。

实验实例：

- 1、取 0.1g 小鼠肾脏组织加入 1mL 试剂一进行样本处理，取上清按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得 A 测定管=0.524、A 标准管=0.458、A 空白管=0.082，计算 ΔA 测定管=A 测定管-A 空白管=0.524-0.082=0.442， ΔA 标准管=A 标准管-A 空白管=0.458-0.082=0.376，按样本质量计算含量得：
氨基酸含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) = $10 \times \Delta A$ 测定管 \div ΔA 标准管 \div W = $10 \times 0.442 \div 0.376 \div 0.1 = 117.55 \mu\text{mol/g}$ 质量。
- 2、取 0.1g 木槿加入 1mL 试剂一进行样本处理，取上清后按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得 A 测定管=0.674、A 标准管=0.458、A 空白管=0.082，计算 ΔA 测定管=A 测定管-A 空白管=0.674-0.082=0.592， ΔA 标准管=A 标准管-A 空白管=0.458-0.082=0.376，按样本质量计算含量得：
氨基酸含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) = $10 \times \Delta A$ 测定管 \div ΔA 标准管 \div W = $10 \times 0.592 \div 0.376 \div 0.1 = 157.45 \mu\text{mol/g}$ 质量。

相关发表文献：

- [1] Li Z, Wang R, Gao Y, et al. The Arabidopsis CPSF30-L gene plays an essential role in nitrate signaling and regulates the nitrate transceptor gene NRT 1.1[J]. New Phytologist, 2017, 216(4): 1205-1222.
- [2] Wang C, Zhang W, Li Z, et al. FIP1 plays an important role in nitrate signaling and regulates CIPK8 and CIPK23 expression in Arabidopsis[J]. Frontiers in plant science, 2018, 9: 593.
- [3] Wang N, Zhang X, Wang S, et al. Structural characterisation and immunomodulatory activity of polysaccharides from white asparagus skin[J]. Carbohydrate polymers, 2020, 227: 115314.

参考文献：

- [1] Lee S W, Lim J M, Bhoo S H, et al. Colorimetric determination of amino acids using genipin from Gardenia jasminoides[J]. Analytica chimica acta, 2003, 480(2): 267-274.
- [2] Kalant H. Colorimetric Ninhydrin Reaction for Measurement of α -Amino Nitrogen[J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(2): 265-266.

相关系列产品：

- BC0290/BC0295 脯氨酸 (Pro) 含量检测试剂盒
- BC0180/BC0185 半胱氨酸 (Cys) 含量检测试剂盒

