氨基酸(amino acid, AA)含量测定试剂盒说明书

微量法 100T/96S

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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。

组成：

产品名称	AC016-100T/96S	Storage
试剂一：液体	100ml	4℃
试剂二：液体	100ml	4℃
试剂三：粉剂	1 瓶	4℃ 避光
试剂四：粉剂	1 管	4℃ 避光
说明书	1 份	

试剂三临用前加入 1.667ml 无水乙醇，盖紧后充分混匀，再加入 23.333ml 试剂二混匀，避光保存。

试剂四临用前加 2.5ml 试剂二，充分溶解。

自备仪器和用品：

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。

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，8000g，4℃离心 10min，取 200μl 上清转移到 1.5 ml EP 管中，加入 200μl 试剂二盖紧后（防止水分散失）置于沸水浴 15 min，冷却至室温后待测。

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 200μl 上清转移到 1.5 ml EP 管中，加入 200μl 试剂二盖紧后（防止水分散失）置于沸水浴 15 min，冷却至室温后待测。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利

伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司
江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号
服务热线：0518-81263339
官网:http://www.bio149.com

3、血清等液体：取 200μl 转移到 1.5 ml EP 管中，加入 200μl 试剂二盖紧后（防止水分散失）置于沸水浴 15 min，冷却至室温后待测。

测定步骤：

1. 酶标仪预热 30 min，调节波长到 570 nm。

2. 取 EP 管，加入 20μl 待测液，200μl 试剂二，200μl 试剂三和 20μl 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。

氨基酸含量计算公式：

使用 96 孔板测定的计算公式如下

标准曲线：y = 0.0027x + 0.0737 R2 = 0.9994　　x：亮氨酸标准品浓度（μg/ml）

y：吸光值 A

（1）按蛋白浓度计算

氨基酸含量（μg /mg prot）=370.4×(A 测定-0.0737)×V 样×(V 样总 ÷V 样)×2÷Cpr

=740.8×(A 测定-0.0737)÷Cpr

（2）按样本质量计算

氨基酸含量（μg /g 鲜重）=370.4×(A 测定-0.0737)×V 样×(V 样总 ÷V 样)×2÷W

=740.8×(A 测定-0.0737)÷W

（3）按细胞数量计算

氨基酸含量（μg /104 cell）=370.4×(A 测定-0.0737)×V 样×(V 样总 ÷V 样)×2÷细胞数量

=740.8×(A 测定-0.0737)÷细胞数量

（4）按照液体体积计算

氨基酸含量（μg /ml）=370.4×(A 测定-0.0737)×2

=740.8×(A 测定-0.0737)

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℃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，用试剂二稀释后再测定。

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。

4．最低检出限为 100μmol/L。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利