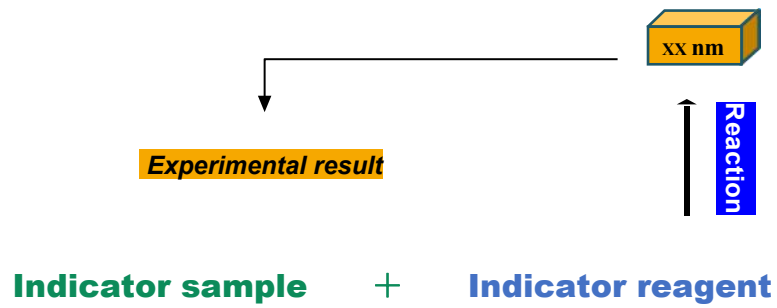


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

游离氨基酸 (AA) 含量检测试剂盒说明书

微量法

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

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂三	粉剂×1 瓶	4℃避光保存	临用前加入 1mL 无水乙醇，盖紧后充分混匀，再加入14mL 蒸馏水混匀，避光保存。
试剂四	粉剂×1 支	4℃避光保存	临用前加 2 mL 蒸馏水，充分溶解
标准品	粉剂×1 支	4℃避光保存	10mg 半胱氨酸，临用前加入 8.26mL 蒸馏水，得到 10μmol/mL的半胱氨酸标准溶液备用。

产品说明书：

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 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。

试验中所需的仪器和试剂：

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、样品的提取：

1. 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 1.5 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，10000rpm，4℃离心 10min，取上清液，待测。
2. 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），盖紧后（防止水分散失）置于沸水浴提取 15min；10000rpm，4℃离心 10min，取上清液，待测。
3. 液体：吸取 0.5mL 液体加入 0.5mL 提取液，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 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。

氨基酸含量计算:

(1) 按样本鲜重计算

氨基酸含量 ($\mu\text{mol} / \text{g}$ 鲜重) = $(C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管}) \div (W \div V \text{ 样总} \div V \text{ 样}) = 10 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \div W$

(2) 按蛋白浓度计算

氨基酸含量 ($\mu\text{mol} / \text{mg prot}$) = $(C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管}) \div (C_{pr} \times V \text{ 样}) = 10 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \div C_{pr}$

(3) 按细菌或细胞数量计算

氨基酸含量 ($\mu\text{mol} / 10^4 \text{ cell}$) = $[C \text{ 标准品} \times V \text{ 标准品} \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管}] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) = 0.02 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$

(4) 按液体体积计算

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

C 标准品: 标准品浓度, $10 \mu\text{mol} / \text{mL}$; V 标准品: 反应体系中加入标准品体积, 0.01 mL; W: 样品鲜重, g; V 样: 反应体系中加入样品体积, 0.01 mL; V 样总: 样品提取液总体积, 1 mL; 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, (V 液体 + V 提取) / 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，如果测定的吸光值过高（高于 1.5），用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。
4. 如果测定数值较小，可适当增加组织或细胞的样本量，液体样本可调整和提取液的比例（如将 0.5mL 液体+0.5mL 提取液改为 0.7mL 液体+0.3mL 提取液）