氨基酸(amino acid, AA)含量测定试剂盒说明书

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	液体 60mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	粉剂 4 瓶	4℃保存	每瓶： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 每瓶加入 1.5mL 无水乙醇，盖紧后充分混匀，再加入 13.5mL 试剂一混匀制备成反应 mix,10 天内用完。
试剂三	粉剂 3 支	4℃保存	每支： 1. 临用前 8000g 4°C 离心 2mim 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 每支再加 1.5 mL 蒸馏水充分溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存(可保存一个月)，禁止反复冻融，解冻后可 4℃保存并一周内使用完。
标准品	液体 1.5mL×1 支	4℃避光保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

[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、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、**无水乙醇**、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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℃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℃离心 10min，上清液置冰上待测。

[注]:也可按照细菌或细胞数量（104 个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例提取。

本实验亦可用裂解液裂解细胞样本进行后续实验检测，裂解方式以裂解液操作说明为准。

③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30 min，调节波长到 570 nm。

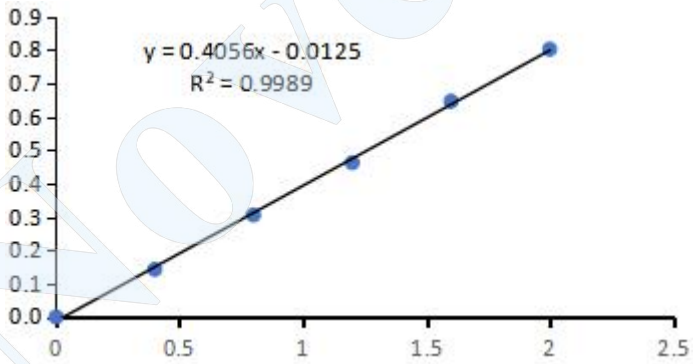
② 在 EP 管中按照下表依次加入试剂：

试剂组分（μL）	测定管	空白管（只做一次）
蒸馏水		40
上清液	40	
反应 mix	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 200μL 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，ΔA=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 = 0.4056x - 0.0125；x 是标准品摩尔浓度(μmol/mL)，y 是ΔA。



2、按样本质量计算：

氨基酸含量(μmol/g 重量)=[(ΔA+0.0125)÷0.4056×V1]÷(V1÷V×W)×D

=2.47×(ΔA+0.0125)÷W×D

氨基酸含量(μg/g 重量)=[(ΔA+0.0125)÷0.4056×V1]÷(V1÷V×W)×D×Mr

=323.4×(ΔA+0.0125)÷W×D

3、按细胞数量计算：

氨基酸含量(μmol/10^4 cell)=[(ΔA+0.0125)÷0.4056×V1]÷(V1÷V×细胞数量)×D

=2.47×(ΔA+0.0125)÷细胞数量×D

氨基酸含量(μg/10^4 cell)=[(ΔA+0.0125)÷0.4056×V1]÷(V1÷V×细胞数量)×D×Mr

=323.4×(ΔA+0.0125)÷细胞数量×D

4、按照液体体积计算：

氨基酸含量(μmol/mL)=[(ΔA+0.0125)÷0.4056×V1]÷V1×D=2.47×(ΔA+0.0125)×D

氨基酸含量(μg/mL)=[(ΔA+0.0125)÷0.4056×V1]÷V1×D=2.47×(ΔA+0.0125)×D×Mr

$=323.4\times(\Delta A+0.0125)\times D$

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　标准品母液浓度为 10μmol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.μmol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2　标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 200uL，加入 1800uL 蒸馏水，混匀得到 1μmol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μmol/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3　依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称（μL）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标品	40	
蒸馏水		40
反应 mix	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 200μL 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，△A=A 测定-0 浓度管。		