

氨基酸（AA）含量检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

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 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 12 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

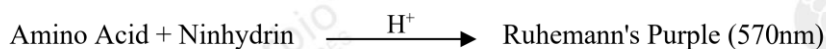
溶液的配制：

- 1、试剂三：临用前加入 0.8 mL 无水乙醇，充分溶解，再加入 11.2 mL 蒸馏水混匀，2-8℃避光保存 4 周。
- 2、试剂四：临用前加入 1.66 mL 蒸馏水，充分溶解，2-8℃可保存 4 周。
- 3、标准品：10 μmol/mL 谷氨酸标准液；
- 4、1.25 μmol/mL 谷氨酸标准溶液：临用前取 100 μL 10 μmol/mL 谷氨酸标准溶液，加入 700 μL 蒸馏水，充分混匀，得到 1.25 μmol/mL 谷氨酸标准溶液，现用现配。

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。



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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、无水乙醇（99%AR）、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）

1. 组织：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）进行冰浴匀浆，之后置于沸水浴提取 15min（封口膜缠口防止爆盖），自来水冷却后 10000rpm，常温离心 10min，取上清液待测。





2. 细菌/细胞：按照细胞数量（ 10^6 个）：试剂一体积（mL）为 5~10：1 的比例（建议 5×10^6 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 2 秒，间隔 3 秒，总时间 3min），之后置于沸水浴提取 15min（封口膜缠口防止爆盖），自来水冷却后 10000rpm，常温离心 10min，取上清待测。
3. 血清（浆）等液体样本：吸取 0.5mL 液体加入 0.5mL 试剂一，置于沸水浴提取 15 min（封口膜缠口防止爆盖）；自来水冷却后 10000rpm，常温离心 10min，取上清液待测。（若测定数值过高或过低，可以调整液体和试剂一的比例）

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，分光光度计蒸馏水调零。
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（缠封口膜，防止爆盖），置于沸水浴中保温 15min，冷却后反复颠倒 EP 管数次，10000rpm 离心 10min 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。空白管和标准管只需测 1-2 次。

三、氨基酸含量计算

1. 按样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{氨基酸含量} (\mu\text{mol/g 质量}) &= \Delta A_{\text{测定管}} \times (C_{\text{标准品}} \div \Delta A_{\text{标准管}}) \times V_{\text{样}} \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \times F \\ &= 1.25 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div W \times F \end{aligned}$$

2. 按蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{氨基酸含量} (\mu\text{mol/mg prot}) &= \Delta A_{\text{测定管}} \times (C_{\text{标准品}} \div \Delta A_{\text{标准管}}) \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \times F \\ &= 1.25 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div C_{\text{pr}} \times F \end{aligned}$$

3. 按细菌或细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{氨基酸含量} (\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) &= \Delta A_{\text{测定管}} \times (C_{\text{标准品}} \div \Delta A_{\text{标准管}}) \times V_{\text{样}} \div (N \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \times F \\ &= 1.25 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \div N \times F \end{aligned}$$

4. 按液体体积计算

$$\text{氨基酸含量} (\mu\text{mol/mL}) = \Delta A_{\text{测定管}} \times (C_{\text{标准品}} \div \Delta A_{\text{标准管}}) \times 2 \times F = 2.5 \times \Delta A_{\text{测定管}} \div \Delta A_{\text{标准管}} \times F$$

C 标准品：标准品浓度，1.25μmol/mL；V 样：反应体系中加入样本体积，0.01mL；W：样本质量，g；V 样总：样本总体积，1mL；C_{pr}：上清液蛋白质浓度，mg/mL；N：细菌或细胞总数，以 10^6 计；2：提取液体时的稀释倍数，(V 液体+V 试剂一)/V 液体=2；F：样本上清液稀释倍数。

注意事项：

- 1、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。
- 2、如果 ΔA 测定管大于 1，建议将样本用试剂一稀释后进行测定。
- 3、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 0.1045g 合欢叶片组织加入 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 ΔA 测定管=A 测定管-A 空白管=0.540-0.088=0.452， ΔA 标准管=A 标准管-A 空白管=0.596-0.088=0.508，按样本质量计算含量得：
氨基酸含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) = $1.25 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times W \times F = 10.643 \mu\text{mol/g}$ 质量。
- 2、取 0.1051g 大鼠肝脏组织加入 1mL 试剂一进行样本处理，取上清稀释 3 倍后按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得 ΔA 测定管=A 测定管-A 空白管=0.756-0.088=0.668， ΔA 标准管=A 标准管-A 空白管=0.596-0.088=0.508，按样本质量计算含量得：
氨基酸含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) = $1.25 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times W \times F = 46.918 \mu\text{mol/g}$ 质量。
- 3、取 0.5mL 马血清加入 0.5mL 试剂一进行样本处理，取上清稀释 2 倍后按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得 ΔA 测定管=A 测定管-A 空白管=0.704-0.088=0.616， ΔA 标准管=A 标准管-A 空白管=0.596-0.088=0.508，按样本体积计算含量得：
氨基酸含量 ($\mu\text{mol/mL}$) = $2.5 \times \Delta A \text{ 测定管} \div \Delta A \text{ 标准管} \times F = 6.063 \mu\text{mol/mL}$ 。

相关发表文献：

- [1] Li X, Peng X, Zhang C, Bai X, Li Y, Chen G, Guo H, He W, Zhou X, Gou X. Bladder Cancer-Derived Small Extracellular Vesicles Promote Tumor Angiogenesis by Inducing HBP-Related Metabolic Reprogramming and SerRS O-GlcNAcylation in Endothelial Cells. *Adv Sci (Weinh)*. 2022 Oct;9(30):e2202993. doi: 10.1002/adv.202202993. Epub 2022 Aug 31. PMID: 36045101; PMCID: PMC9596856.
- [2] Wang L, Hao J, Yu X, Zhang B, Sui J, Wang C. Method development for the identification, extraction and characterization of melanoidins in thermal hydrolyzed sludge. *Sci Total Environ*. 2023 Mar 15;864:161204. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.161204. Epub 2022 Dec 27. PMID: 36581290.
- [3] Zhuang S, Liu Y, Gao S, Tan Y, Hong H, Luo Y. Mechanisms of fish protein degradation caused by grass carp spoilage bacteria: A bottom-up exploration from the molecular level, muscle microstructure level, to related quality changes. *Food Chem*. 2023 Mar 1;403:134309. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.134309. Epub 2022 Sep 19. PMID: 36191413.
- [4] Gao S, Fu Z, Zhang L, Li B, Tan Y, Hong H, Luo Y. Oxidation and side-chain modifications decrease gastrointestinal digestibility and transport of proteins from salted bighead carp fillets after frozen storage. *Food Chem*. 2023 Dec 1;428:136747. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.136747. Epub 2023 Jun 26. PMID: 37413834.
- [5] Shi Y, Liu D, He Y, Tang J, Chen H, Gong P, Luo JS, Zhang Z. CHLORIDE CHANNEL-b mediates vacuolar nitrate efflux to improve low nitrogen adaptation in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2023 Oct 26;193(3):1987-2002. doi: 10.1093/plphys/kiad438. PMID: 37527482.

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

