

# 总氨基酸测定试剂盒说明书

(货号: A026-1-1 80管/78样 比色法)

**免责声明:** 测试前请仔细阅读说明书, 预试后再进行批量实验,

否则由此导致的后果用户自行承担!

## 一、试剂组成与配制: (试剂盒有效期 6 个月)

**试剂一:** 粉剂×1 支, 4℃ 保存。

**试剂二:** 液体 5mL×1 瓶, 4℃ 保存。

**氨基酸反应液的配制:** 将试剂一加到 160mL 蒸馏水中, 充分混匀成蓝色混悬液, 再缓慢滴加试剂二, 边滴边搅至混悬液全部转换成淡蓝色透明溶液为止, 4℃ 保存 (粉剂较难溶解, 试剂二滴加完后还需室温搅拌混匀半小时以上才能溶解完全, 可提前配制好)。

**试剂三:** 粉剂×1 支, 4℃ 保存。将试剂三加蒸馏水 80mL 充分混匀溶解后即**为氨基酸显色剂**。(注意: 有腐蚀性, 配制时勿碰皮肤。)

**试剂四:** 甘氨酸标准品 75.07mg/支×6 支, 4℃ 保存。用时将一支标准品粉剂溶于 20mL 蒸馏水中, 充分混匀配成 **50μmol/mL 甘氨酸标准溶液**, 现用现配。

**试剂五:** 液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存。

## 二、测定原理:

铜离子 (Cu<sup>2+</sup>) 能与各种氨基酸络合产生蓝绿色络合物, 在一定波长下颜色的深浅与总氨基酸的含量成正比, 故可以用可见分光光度计测其吸光度, 通过换算得到总氨基酸含量。

## 三、所需仪器及试剂:

可调 650nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或酶标仪及 96 孔板), 涡旋混匀器, 离心机, 试管或离心管, 蒸馏水, 秒表, 各种规格移液器。

## 四、操作步骤:

### (一) 样本前处理:

**1、组织样本:** 准确称取组织重量约 0.1g, 按重量体积比 0.1g: 0.9mL 的比例加入生理盐水, 匀浆, 制成 10% 匀浆, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清 (此匀浆上清需进行蛋白浓度测定) 0.5mL, 加入 0.5mL 试剂五 (如样本量较少, 可按比例减少匀浆上清及试剂五的用量), 涡旋混匀后 4000 转/分离心 10 分钟, 取上清进行显色反应;

**2、血清 (浆) 等高蛋白液体样本:** 取血清 (浆) 0.2mL, 加入 0.8mL 的试剂五 (如样本量较少, 可按比例减少血清 (浆) 及试剂五的用量), 涡旋混匀后 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清进行显色反应;

**3、尿液等低蛋白液体样本:** 直接取样进行显色反应 (如有固体物存在, 需 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清进行显色反应)。

### (二) 操作表: (显色反应)

	空白管	标准管	测定管
蒸馏水 (mL)	0.6		
50μmol/mL 氨基酸标准液 (mL)		0.6	
前处理后的样本上清 (mL)			0.6
氨基酸反应液 (mL)	1.8	1.8	1.8
旋涡混匀			
氨基酸显色剂 (mL)	0.6	0.6	0.6
涡旋混匀, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液于 650nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 分光光度计读取吸光值 A (或是每管取 200μL 反应液加到 96 孔板中, 酶标仪 650nm 处读数)。			

## 2、计算公式:

### (1) 组织样本按蛋白计算:

$$\text{组织中总氨基酸含量} (\mu\text{mol/mg 蛋白}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times 2$$

### (2) 组织样本按鲜重计算:

$$\text{组织中总氨基酸含量} (\mu\text{mol/g 组织}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{W}{V_{\text{样总}}} \times 2$$

### (3) 血清 (浆) 等高蛋白液体样本计算:

$$\text{血清中总氨基酸含量} (\mu\text{mol/mL}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times 5$$

### (4) 尿液等低蛋白液体样本计算:

$$\text{尿液中总氨基酸含量} (\mu\text{mol/mL}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times N$$

以上公式中:

**C<sub>标准</sub>:** 标准液浓度, 50μmol/mL;

**W:** 组织重量, g;

**V<sub>样总</sub>:** 组织样本匀浆时加入的生理盐水的总体积, mL

**N:** 尿液等低蛋白液体样本测试前稀释倍数;

**注:** 常数“2”或“5”为组织或血清 (浆) 样本加试剂五时的稀释倍数, 组织为 1:1 (即 2 倍), 血清 (浆) 为 1:4 (即 5 倍)。

### (5) 按标曲计算: (标曲制作方法见附录 1)

若是制作标曲计算, 则将制得的标曲计算公式替换

前面公式中的  $\frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}}$  即可, 其

余不变 (样本的绝对 OD 值等于 A<sub>测定</sub>-A<sub>空白</sub>)。

## 六、优点:

- 1、操作简单、价格便宜。目前国内外检测氨基酸的方法大多太复杂, 且费用相当昂贵。
- 2、快速。本反应只要 15 分钟即可结束检查。
- 3、稳定性好, 该法经多次重复试验, 其结果相当稳定。
- 4、本法测定的是游离态的氨基酸。

## 七、注意点:

- 1、在配制氨基酸反应液滴加试剂二时, 一定要缓慢, 尽量要使混悬物完全溶解, 使氨基酸反应液变浅蓝色透明状态。
- 2、试剂三在配制时要注意, 尽量避免碰到皮肤, 该试剂有一定腐蚀性。

## 附录 I :标准曲线的制备 (选做)

### 1、操作步骤:

- ①、将一支标准品溶于 10mL 蒸馏水中配成 100 $\mu$ mol/mL 标准溶液, 再将其用蒸馏水稀释成 10、20、40、60、80  $\mu$ mol/mL 的标准溶液, 充分混匀, 现用现配。稀释方法如下:

100 $\mu$ mol/mL 标准液用量(mL)	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8
蒸馏水用量(mL)	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2
相当于标准液浓度 ( $\mu$ mol/mL)	10	20	40	60	80

### ②、操作表:

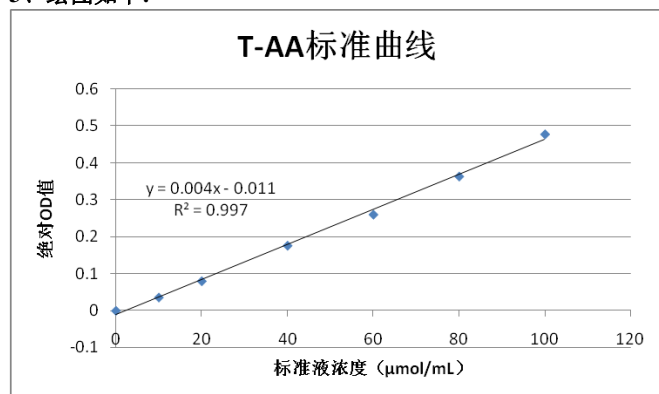
	空白管	标准管
各浓度氨基酸标准液(mL)		0.6
蒸馏水(mL)	0.6	
氨基酸反应液(mL)	1.8	1.8
旋涡混匀		
氨基酸显色剂(mL)	0.6	0.6

涡旋混匀, 4000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液于 650nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 分光光度计读取吸光值 A (或是每管取 200 $\mu$ L 反应液加到 96 孔板中, 酶标仪 650nm 处读数)。

### 2、测定结果:

标准液浓度 (mmol/L)	0	10	20	40	60	80	100
吸光值 (OD 值)	0.009	0.045	0.089	0.185	0.269	0.372	0.486
绝对 OD 值	0	0.036	0.080	0.176	0.260	0.363	0.477

### 3、绘图如下:



若是制作了标准曲线, 则可将原计算公式中的

$$\frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}}$$

用代入标曲计算所得的值代替, 继续运算

即可得最终结果 (一般情况下, 标曲可不作)。