

总氨基酸测定试剂盒

(货号: BC118 80管/78样 比色法)

一、试剂的组成与配制: (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: 将试剂一加蒸馏水 160mL, 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^{2+}) 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:

- 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 (此匀浆上清可进行蛋白浓度测定) 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;
- 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;
- 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) 组织样本按蛋白浓度计算：

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

(2) 组织样本按鲜重计算：

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

(3) 血清（浆）等高蛋白液体样本计算：

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

(4) 尿液等低蛋白液体样本计算：

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

$C_{\text{标准}}$:标准液浓度, 50 $\mu\text{mol}/\text{mL}$;

W : 组织重量, g;

$V_{\text{样总}}$: 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：（标曲制作方法检附录 I）

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

$$\frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \text{ 即可，其余不变（样本的绝对 OD 值等于 } A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} \text{）。$$

五、计算举例：

例 1：取 10%小鼠肝组织匀浆上清原液前处理后按操作表进行检测，测得空白管吸光度为 0.009，标准管吸光度为 0.232，测定管吸光度为 0.035，同时测得 10%匀浆上清蛋白浓度为 10.25mgprot/mL,则计算结果为：

$$\begin{aligned} \text{组织中总氨基酸含量} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg蛋白质}} \right) &= \frac{0.035 - 0.009}{0.232 - 0.009} \times 50 \div 10.25 \times 2 \\ &= 1.137 \mu\text{mol}/\text{mg蛋白质} \end{aligned}$$

例 2：取小鼠血清前处理后按操作表进行检测，测得空白管吸光度为 0.009，标准管吸光度为 0.232，测定管吸光度为 0.020，则计算结果为：

$$\begin{aligned} \text{血清中总氨基酸含量} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}} \right) &= \frac{0.020 - 0.009}{0.232 - 0.009} \times 50 \times 5 \\ &= 12.332 \mu\text{mol}/\text{mL} \end{aligned}$$

例 3：取尿液原液按操作表进行检测，测得空白管吸光度为 0.009，标准管吸光度为 0.232，测定管吸光度为 0.189，则计算结果为：

$$\begin{aligned} \text{尿液中总氨基酸含量} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}} \right) &= \frac{0.138 - 0.009}{0.232 - 0.009} \times 50 \times 1 \\ &= 28.92 \mu\text{mol}/\text{mL} \end{aligned}$$

六、优点：

- 1、简单、便宜。目前国内外检测氨基酸的方法太复杂，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，且尽量要使混悬物完全溶解。使氨



ELK Biotechnology

Tel:+86-027-59760950 Website: www.elkbiotech.cn

基酸反应液变浅蓝色透明。

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

1、操作步骤:

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

100 μ 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 (μ 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		
氨基酸显色液(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 μ 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:

