

# 总氨基酸测定试剂盒说明书(精简版)

(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、试剂的组成与配制:

**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:** 将试剂一加双蒸水 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)。

**试剂三:** 粉剂×1支, 4℃保存。

**氨基酸显色剂配制:** 将试剂三加水 80mL 充分混匀。(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。

**50mmol/L 甘氨酸标准溶液的配制:** 将一支甘氨酸标准品溶于 20mL 双蒸水中, 充分混匀, 现用现配。

**试剂五:** 液体 100mL×1瓶, 4℃保存。

## 二、所需仪器耗材及试剂:

含 650nm 波长的分光光度计及 1cm 光径比色皿 (或酶标仪及 96 孔板)、台式低速离心机 (3500rpm)、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水 (0.9%) 或 PBS (0.1M)、涡旋混匀器、试管或离心管、蛋白测定试剂 (组织及细胞样本用, 本公司有售)。

## 三、操作步骤:

### (一)、尿液的测定:

#### 1、操作表:

	空白管	标准管	测定管
双蒸水 (mL)	1		
50μmol/mL 氨基酸标准液 (mL)		1	
尿液 (mL)			1
氨基酸反应液 (mL)	2	2	2
旋涡混匀			
氨基酸显色剂 (mL)	1	1	1
混匀, 3500 转/分离心 10 分钟, 取上清液于 650nm 处, 1 cm 光径, 双蒸水调零比色。			

#### 2、计算公式:

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

**C<sub>标准</sub>:** 标准液浓度, 50μmol/mL;

**N:** 样本测试前稀释倍数。

### (二)、血清 (浆) 的测定:

#### 1、操作表:

	空白管	标准管	测定管
双蒸水 (mL)	0.3		
50μmol/mL 氨基酸标准液 (mL)		0.3	
血清 (浆) (mL)			0.3
试剂五 (mL)	1.2	1.2	1.2
充分混匀, 3500 转/分离心 10 分钟取 1mL 上清液待测。			
上清液 (mL)	1	1	1
氨基酸反应液 (mL)	2	2	2
旋涡混匀			
氨基酸显色剂 (mL)	1	1	1
混匀, 3500 转/分离心 10 分钟, 取上清液于 650nm 处, 1 cm 光径, 双蒸水调零比色。			

#### 2、计算公式:

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

**C<sub>标准</sub>:** 标准液浓度, 50μmol/mL;

**N:** 样本测试前稀释倍数。

## (三)、组织的测定:

**1、样本前处理:** 准确称取组织重量, 按重量体积比加入 9 倍生理盐水, 制成 10% 匀浆, 3500 转/分离心 10 分钟, 取上清待测。同时取 10% 匀浆上清进行蛋白测定。

#### 2、操作表:

	空白管	标准管	测定管
双蒸水 (mL)	0.3		
50μmol/mL 氨基酸标准液 (mL)		0.3	
匀浆 (mL)			0.3
试剂五 (mL)	1.2	1.2	1.2
充分混匀, 3500 转/分离心 10 分钟取 1mL 上清待测。			
上清 (mL)	1	1	1
氨基酸反应液 (mL)	2	2	2
旋涡混匀			
氨基酸显色剂 (mL)	1	1	1
混匀, 3500 转/分离心 10 分钟, 取上清液于 650nm 处, 1 cm 光径, 双蒸水调零比色。			

#### 3、计算公式:

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

**C<sub>标准</sub>:** 标准液浓度, 50μmol/mL;

**C<sub>pr</sub>:** 组织样本蛋白浓度, mg/mL。

#### 4、计算举例:

取 10% 小鼠肝组织匀浆 0.3mL 按操作表进行检测, 测得空白管吸光度为 0.051, 标准管吸光度为 0.123, 测定管吸光度为 0.067, 同时测得 10% 匀浆上清蛋白浓度为 8.251mgprot/mL, 则计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{组织中总氨基酸含量} (\mu\text{mol/mg 蛋白}) &= \frac{0.067 - 0.051}{0.123 - 0.051} \times 50 \div 8.251 \\ &= 1.347 \mu\text{mol/mg 蛋白} \end{aligned}$$

## 四、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。

## 五、注意点:

- 1、在滴加试剂二时, 一定要缓慢, 且尽量要使混悬物完全溶解。使氨基酸反应液成为浅蓝色透明溶液。
- 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。
- 3、做本试验后的试管要用热水加肥皂煮, 自来水冲洗干净, 否则用这种试管测量其它酶反应时会影响酶的活力。推荐使用一次性实验用塑料试管操作 (本所有售)。

## 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。

## 附录 I :标准曲线的制备

### 1、操作步骤:

①、50mmol/L 甘氨酸标准溶液的配制: 将一支甘氨酸标准品溶于 20mL 双蒸水中, 充分混匀, 现用现配。

### ②、操作表:

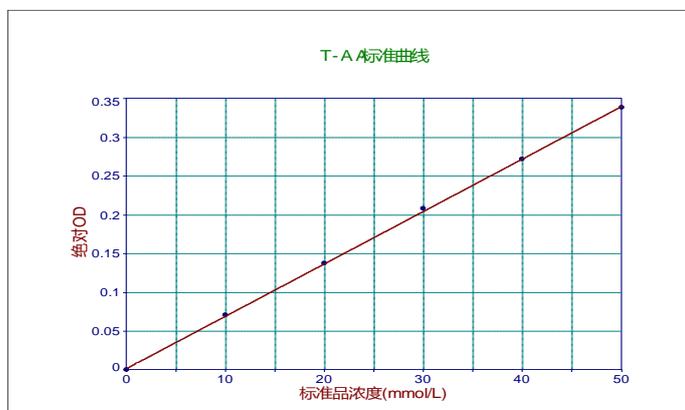
	0	1	2	3	4	5
50mmol/L 氨基酸标准品(mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
双蒸水(mL)	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
氨基酸反应液(mL)	2	2	2	2	2	2
旋涡混匀						
氨基酸显色液(mL)	1	1	1	1	1	1

混匀, 3500 转/分离心 10 分钟, 取上清于 650nm 处, 1 cm 光径, 双蒸水调零比色。

### 2、测定结果:

	0	1	2	3	4	5
氨基酸标准品浓度 (mmol/L)	0	10	20	30	40	50
吸光度 OD 值	0.012	0.083	0.150	0.220	0.284	0.351
绝对吸光度 OD 值	0	0.071	0.138	0.208	0.272	0.339

### 3、绘图如下:



标准曲线用户可以不画, 只需按前面给的计算公式计算即可。