氨基酸(AA)检测试剂盒(茚三酮微板法)

产品简介:

氨基酸(Amino acid，AA)是组成蛋白质的基本单位，也是蛋白质的分解产物。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，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。另外，氨基酸还能反映灼伤、伤寒等方面情况。

氨基酸(AA)检测试剂盒(茚三酮微板法)(Amino Acid Assay kit)检测原理是在弱酸条件下，氨基酸与茚三酮共热情况下能定量的产生蓝紫色的二酮茚胺(又称Ruhemans紫)，其吸收峰在波长 570nm 处，在一定范围内颜色深浅(即吸光度)与氨基酸浓度成正比，该试剂盒主要用于检测植物组织、血清、尿液、食品、药品等中的总游离氨基酸含量。该试剂盒仅用于科研领域，不宜用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

编号 / 名称	GCTC2151 100T	Storage
试剂(A): 氨基酸标准(50μg/ml)	1ml	-20℃
试剂(B): AA Lysis buffer(5×)	50ml	RT
试剂(C): 茚三酮	0.1g	4℃ 避光
试剂(D): 茚三酮稀释液	10ml	RT 避光
试剂(E): AA Assay buffer	1ml	RT
试剂(F): 维生素 C	2 支	RT 避光
使用说明书	1 份	

自备材料:

1、无氨蒸馏水或去离子水、60%乙醇

2、水浴锅或恒温箱、研钵或匀浆器、磁力搅拌器或超声波

3、离心机、离心管或试管、96 孔板、酶标仪

操作步骤(仅供参考):

1、配制 AA Lysis buffer (1×)：取 1 份 AA Lysis buffer (5×)加 4 份去离子水混匀即成。

2、准备样品:

①植物样品：取新鲜植物组织，清洗干净，擦干，切碎，迅速称取 0.4g，按植物组织:AA Lysis buffer(1×)=0.4g：2.0ml 的比例加入 AA Lysis buffer 匀浆或研磨，用无氨

蒸馏水稀释至 40ml，混匀，用滤纸过滤，滤液即为氨基酸粗提液，4℃保存备用。

②血浆、血清和尿液样品：血浆、血清按照常规方法制备后可以直接用于本试剂盒的测定，-20℃冻存，用于氨基酸的检测。

③细胞或组织样品：取恰当细胞或组织裂解液，如有必要用 AA Lysis buffer(1×)进行匀浆，1000g 离心 5min，留取上清即为氨基酸粗提液，4℃保存，用于氨基酸检测。

④高浓度样品：如果样品中含有较高浓度的氨基酸，可以使用 AA Lysis buffer(1×)进行恰当的稀释。

3、配制茚三酮显色液：将 50mg 茚三酮加入到 5ml 茚三酮稀释液中，搅拌或超声处理至完全溶解，即为茚三酮显色液。4℃避光保存，10 天有效。注意：茚三酮显色液 10 天用不完，应丢弃，重新配制。可称取一定量的茚三酮再加稀释液使终浓度为 1%即可。

4、配制茚三酮工作液：取适量的茚三酮显色液、AA Assay buffer，按茚三酮显色液：AA Assay buffer=35：3 的比例混合，即为茚三酮工作液，4℃避光密闭保存，临用现配。注意：AA Assay buffer 所含物质浓度较高，且有刺激性，如有结晶或沉淀，应于 40~70℃密闭温育，使其完全溶解后使用。

5、配制维生素 C 工作液：取出 1 支维生素 C，准确溶解于 10ml 无氨蒸馏水，混匀，4℃预冷备用；一次性用不完，可分装小管后-20℃保存 1 周有效。该试剂盒提供的维生素 C 及其配制的工作液为过量。

6、配制系列氨基酸标准溶液：取出氨基酸标准(50μg/ml)恢复至室温，用无氨蒸馏水将其稀释至 10μg/ml，然后按下表继续稀释：

加入物(ml)	1	2	3	4	5
氨基酸标准(10μg/ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
无氨蒸馏水	0.4	0.3	0.2	0.1	0
氨基酸浓度(μg/ml)	2	4	6	8	10

7、AA 加样：按照下表设置空白管、标准管、测定管，溶液应按照顺序依次加入，并注意避免产生气泡。如果样品中的氨基酸浓度过高，可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定，样品的检测最好能设置平行管。

加入物(μl)	空白管	标准管	测定管
无氨蒸馏水	30	—	—
系列氨基酸标准(1~5 号管)	—	30	—
待测样品	—	—	30
茚三酮工作液	45	45	45
维生素 C 工作液	15	15	15
混匀，80℃中加热 20min，冰水迅速冷却。			

6、AA 测定：加 60%乙醇 210μl，混匀。转入 96 孔板中，空白调零，酶标仪测定标准管、测定管 570nm 处吸光度(记为 $A_{标准}$、$A_{测定}$)。

计算：以系列氨基酸标准(1~5 号管) 的氨基酸浓度(μg/ml)为横坐标，以对应吸光度为纵坐标，制作标准曲线，根据测定管的吸光度计算其氨基酸浓度。根据如下公式计算具体样品中氨基酸的含量：

植物组织样品 AA(μg/g)=C×V_T/W

血清、尿液等样品 AA(μg/ml)=C×N

式中：C=测定管的氨基酸浓度(μg/ml)

V_T=样品稀释的总体积(ml)=40(ml)

W=样品鲜重(g)

N=稀释倍数

注意事项：

1、 实验材料应尽量新鲜，如取材后不立即测定，应存于 4℃。

2、 实验中用水尽量保证不被氨污染，否则会强烈干扰反应。

3、 如果样品中含有大量蛋白质或多肽也会影响结果的准确性，应先用蛋白沉淀剂去除而后检测，一般常用乙酸、磺基水杨酸、三氯乙酸等作为沉淀剂。AA Lysis buffer 有蛋白沉淀剂的功能。

4、 氨基酸与茚三酮显色反应可用沸水浴 15min，但易退色；在 80℃水浴中孵育，并适当延长反应时间，可增强显色效果。产生的蓝紫色产物在 1h 内保持稳定，建议尽快检测。

5、 脯氨酸或羟脯氨酸的检测，建议使用 Leagene TC2163 脯氨酸(PRO)检测试剂盒(茚三酮比色法)。

6、 AA Lysis buffer(5×)和 AA Assay buffer 有腐蚀性和挥发性，应小心操作，同时应密闭保存，防止挥发。

7、 空气中的氧有可能干扰显色反应，尽量隔绝空气。

8、 加入维生素 C 可提高反应的灵敏度，并使颜色稳定，但加入过量，将导致吸光度人为偏大，应严格掌握加入的量。

9、 如果没有酶标仪，也可以使用分光光度计测定，但应考虑分光光度计的最小检测体积。

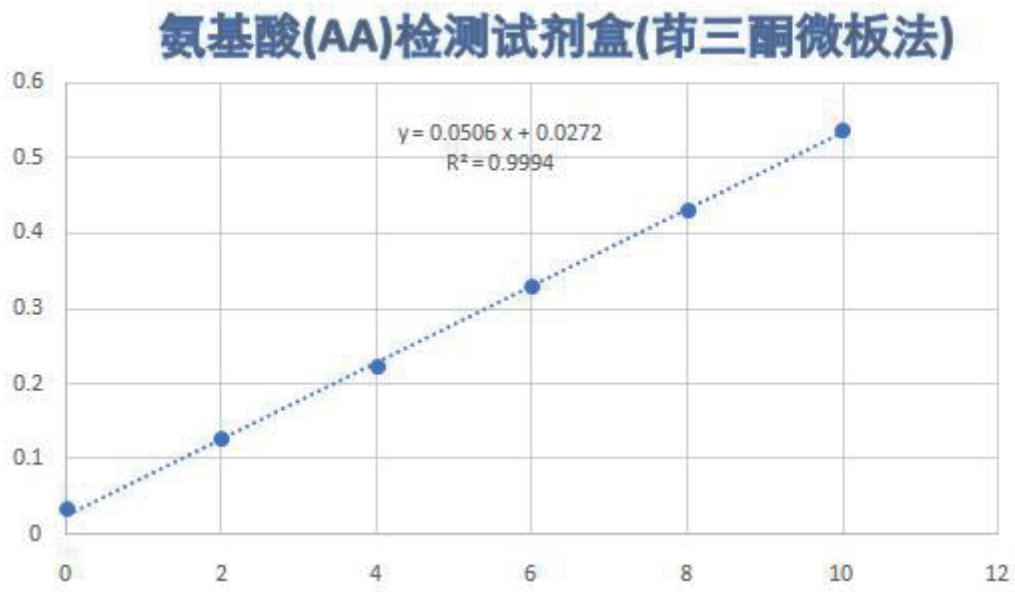
10、 所测样品的浓度过高时，应用 AA Lysis buffer 稀释样品后重新测定。

11、 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

12、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：6 个月有效。低温运输，按要求保存。

附录：参考标准曲线范围：通过酶标仪 570nm 测定氨基酸浓度在 2~10μg/ml 的吸光度，其标准曲线参考如下：



注意：由于检测仪器和操作手法等条件的不同，参考值范围会有波动，该值仅供参考，对于要求精确计算 AA 含量的，可以采用标准曲线进行多点重复测定；根据 测定经验显示氨基酸浓度在 0.5μg/ml 以下及 20μg/ml 以上，标准曲线会有偏差。

相关产品：

产品编号	产品名称
GCDF0135	组织细胞固定液(4% PFA)
GCDP0013	GUS 染色液(即用型)
GCDZ2011	环保浸蜡脱蜡透明液
GCNR0001	DEPC 处理水(0.1%)
GCPS0013	RIPA 裂解液(强)
GCTC2163	脯氨酸(PRO)检测试剂盒(茚三酮比色法)
GCTO1013	丙二醛(MDA)检测试剂盒(TBA 比色法)