

植物氨基酸（AA）含量检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
PYHD1-M48	植物氨基酸（AA）含量检测试剂盒	48T	微量法
PYHD1-M96		96T	

一、测定意义

氨基酸作为组成蛋白质的基本单元，在生物代谢过程中起着关键作用。植物体内氨基酸含量对研究植物在不同时期氮代谢的变化、植物根系生理、植物对氮素的吸收、运输、同化及营养状况等具有重要意义。

二、测定原理

氨基酸中的 α -氨基在加热条件及弱酸环境下能够与水合茚三酮反应生成蓝紫色化合物，产物在 570 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可定量检测氨基酸的含量。

三、试剂组成

试剂名称	试剂装量（48T）	试剂装量（96T）	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	2-8℃避光保存
	使用前每瓶加入 1 mL 无水乙醇（自备）充分溶解再加入 9 mL 蒸馏水充分混匀（现用现配，配制后 4℃可保存一周）		
试剂三	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	2-8℃避光保存
	使用前每瓶加入 1 mL 蒸馏水充分溶解（现用现配，配制后 4℃可保存一周）		
标准品 （10 mg 亮氨酸）	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×1 瓶	2-8℃避光保存
	临用前加入 1 mL 蒸馏水混匀溶解，配制成 10 mg/mL 标准液备用，4℃可保存 2 周。		

四、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）

取一定量植物组织擦净水分及杂质，剪碎后放入研钵，加入液氮，研磨成粉状后转移出来，然后准确称重，按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液）处理样品，室温研磨至匀浆，沸水浴提取 15 min（密封以防止水分散失），冷却至室温，4℃ 10000 g 离心 10 min，取上清液即为待测样本。

二、测定步骤

1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 570nm，蒸馏水调零；

2、不同浓度标准液配制：将 10 mg/mL 标准液用蒸馏水稀释至 200、150、100、50、25、12.5μg/mL。

3、操作表（在离心管中依次加入下列试剂）：

试剂名称	测定管	标准管	空白管
上清液（μL）	10	-	-
标准液（μL）	-	10	-
蒸馏水（μL）	-	-	10
试剂一（μL）	100	100	100
试剂二（μL）	100	100	100
试剂三（μL）	10	10	10
充分混匀，沸水浴 15 min（密封以防止水分散失），立即冷却至室温。混匀，吸取 200 μL 于 96 孔板或微量玻璃比色皿中，测定 540 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 标准和 A 空白，计算 $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{空白}$ ， $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。 注：空白管只需测定 1-2 次。			

五、氨基酸含量的计算：

1、标准曲线的建立：根据标准管的浓度（y，μg/mL）和吸光度 $\Delta A_{标准}$ （x， $\Delta A_{标准}$ ），建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A_{测定}$ （x， $\Delta A_{测定}$ ）带入公式计算样本浓度（y，μg/mL）。

2、按样本质量计算：

$$\text{氨基酸含量}(\mu\text{g/g 质量}) = y \times V_{\text{样总}} \div W \times F = y \div W \times F$$

3、按组织蛋白浓度计算：

$$\text{氨基酸含量}(\mu\text{g/mg prot}) = y \times V_{\text{样总}} \div (C_{pr} \times V_{\text{样总}}) \times F = y \div C_{pr} \times F$$

4、按血清（浆）体积计算：

$$\text{氨基酸含量}(\mu\text{g/mL}) = y \times V_{\text{样总}} \div V_{\text{液}} \times F = 2 \times y \times F$$

V 样总：样本提取后总体积，1 mL；V 液：液体样本提取过程中加入液体样本的体积，0.5 mL；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；F：样本稀释倍数。

六、注意事项：

1、如果测定吸光值超过线性范围吸光值，请将样品用提取液进行适当的稀释再测定，并在计算公式中乘以稀释倍数；

- 2、脯氨酸和羟脯氨酸与茚三酮反应在 570 nm 处无吸收峰，测定结果不含这两种氨基酸的含量；
- 3、提取过程会使蛋白变性，若使用蛋白浓度计算，需单独使用 PBS 提取后再测定蛋白浓度；
- 4、为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定。