

色氨酸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
PYHD5-C24	色氨酸含量检测试剂盒	24T	常量法
PYHD5-C48		48T	

一、测定意义

色氨酸（Tryptophan, Trp）是一种参与多种生物合成过程的必需氨基酸，它不仅参与多种蛋白质的合成，还是许多具有生物活性物质的前体。

二、测定原理

在 H_2SO_4 中，L-色氨酸与对二甲基苯甲醛发生缩合反应，生成希夫碱对二甲氨基苯甲醛缩色氨酸为蓝色，该产物在 600nm 处有吸收峰。

三、试剂组成

试剂名称	试剂装量（24T）	试剂装量（48T）	保存条件
提取液	液体 30 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 35 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃避光保存
试剂二	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×1 瓶	2-8℃保存
	使用前每瓶加入 1 mL 蒸馏水充分溶解，现配现用。		
标准品 (10 mg 色氨酸)	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×1 瓶	2-8℃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，旋涡混匀抽提 3-5 分钟或者使用组织破碎仪冰浴提取，8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 600nm，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 0.25、0.125、0.0625、0.03125、0.015625、0.0078125mg/mL。
- 3、操作表（在 1.5mL 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)	100	-	-
标准液 (μL)	-	100	-
蒸馏水 (μL)	-	-	100
试剂一 (μL)	900	900	900
充分混匀，沸水浴 2 min，冷却至室温			
试剂二 (μL)	10	10	10
充分混匀，沸水浴 3 min（密封以防止水分散失），立即冷却至室温。混匀，吸取 1 mL 于 1 mL 玻璃比色皿中，测定 600 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 标准和 A 空白，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。 注：空白管只需测定 1-2 次。			

五、色氨酸含量的计算：

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

2、按样本质量计算：

$$\text{色氨酸含量(mg/g 质量)} = y \times V_{\text{样总}} \div W \times F = y \div W \times F$$

3、按组织蛋白浓度计算：

$$\text{色氨酸含量 (mg/mg prot)} = y \times V_{\text{样总}} \div (Cpr \times V_{\text{样总}}) \times F = y \div Cpr \times F$$

V 样总：样本提取后总体积，1 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、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；

3、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。