

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K055-M

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 酶标仪(640-660 nm)

Elabscience®总氨基酸(T-AA)比色法测试盒

Total Amino Acids (T-AA) Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于血清(浆)、尿液、动植物组织中的总氨基酸含量检测。

检测原理

铜离子能与各种氨基酸络合产生蓝绿色的络合物，在一定波长下颜色的深浅与总氨基酸的含量成正比。

本试剂盒检测组织样本时，需要测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

提供试剂和物品

| 编号 | 名称 | 规格 1 (Size 1)(48 T) | 规格 2 (Size 2)(96 T) | 保存方式 (Storage) |
|--------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------|
| 试剂一 (Reagent 1) | 粉剂 A (Powder A) | 粉剂×1 瓶 | 粉剂×1 瓶 | 2-8℃ 保存 6 个月 |
| 试剂二 (Reagent 2) | 酸试剂 (Acid Reagent) | 0.4 mL×1 支 | 0.8 mL×1 支 | 2-8℃ 保存 6 个月 |
| 试剂三 (Reagent 3) | 粉剂 B (Powder B) | 粉剂×1 瓶 | 粉剂×1 瓶 | 2-8℃ 保存 6 个月 |
| 试剂四 (Reagent 4) | 粉剂 C (Powder C) | 粉剂×1 支 | 粉剂×1 支 | 2-8℃ 保存 6 个月 |
| 试剂五 (Reagent 5) | 蛋白沉淀剂 (Protein Precipitator) | 8 mL×1 瓶 | 15 mL×1 瓶 | 2-8℃ 保存 6 个月 |
| | 96 孔酶标板 | 1 板 | | |
| | 96 孔覆膜 | 2 张 | | |
| | 样本位置标记表 | 1 张 | | |

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(640-660 nm，最佳检测波长为 650 nm)。

试剂准备

规格 1 (48T)

① 检测前试剂平衡至室温。

② 试剂一工作液配制：

取一瓶试剂一，加入到12 mL双蒸水中，充分搅拌成蓝色浑浊液，然后缓慢滴加0.35 mL试剂二，边加边搅拌至浑浊液全部转换成淡蓝色透明液体，再继续搅拌30 min，完成后2-8℃保存一个月。

③ 试剂三工作液配制：

每瓶试剂三粉剂加入6 mL双蒸水，充分溶解后使用，未用完部分2-8℃保存一个月。

④ 200 mmol/L标准品配制：

每支试剂四粉剂溶于5 mL双蒸水中，充分溶解后使用，未用完部分2-8℃保存一个月。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

| 编号 | ① | ② | ③ | ④ | ⑤ | ⑥ | ⑦ | ⑧ |
|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标准品浓度(mmol/L) | 0 | 10 | 20 | 40 | 50 | 60 | 80 | 100 |
| 200 mmol/L 标准品 (μL) | 0 | 10 | 20 | 40 | 50 | 60 | 80 | 100 |
| 双蒸水 (μL) | 200 | 190 | 180 | 160 | 150 | 140 | 120 | 100 |

规格 2 (96T)

① 检测前试剂平衡至室温。

② 试剂一工作液配制：

取一瓶试剂一，加入到24 mL双蒸水中，充分搅拌成蓝色浑浊液，然后缓慢滴加0.7 mL试剂二，边加边搅拌至浑浊液全部转换成淡蓝色透明液体，再继续搅拌30 min，完成后2-8 ℃保存一个月。

③ 试剂三工作液配制：

每瓶试剂三粉剂加入12 mL双蒸水，充分溶解后使用，未用完部分2-8 ℃保存一个月。

④ 200 mmol/L标准品配制：

每支试剂四粉剂溶于5 mL双蒸水中，充分溶解后使用，未用完部分2-8 ℃保存一个月。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

| 编号 | ① | ② | ③ | ④ | ⑤ | ⑥ | ⑦ | ⑧ |
|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标准品浓度(mmol/L) | 0 | 10 | 20 | 40 | 50 | 60 | 80 | 100 |
| 200 mmol/L 标准品 (μL) | 0 | 10 | 20 | 40 | 50 | 60 | 80 | 100 |
| 双蒸水 (μL) | 200 | 190 | 180 | 160 | 150 | 140 | 120 | 100 |

样本准备

① 样本处理

血清(浆)、尿液等液体样本：可直接测定。

组织样本：常规匀浆处理(生理盐水(0.9% NaCl 溶液)或 PBS(0.01 M, pH 7.4))。匀浆后, 4°C, 10000 × g 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前, 需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 3.64-100 mmol/L, 请参考下表稀释(仅供参考):

| 样本 | 稀释倍数 | 样本 | 稀释倍数 |
|------|------|----------|------|
| 人血清 | 不稀释 | 10%大鼠心组织 | 不稀释 |
| 人尿液 | 不稀释 | 10%大鼠肝组织 | 不稀释 |
| 大鼠血浆 | 不稀释 | 10%小鼠肝组织 | 不稀释 |
| 猪血清 | 不稀释 | 10%绿萝叶组织 | 不稀释 |

注: 稀释液为试剂五。

实验关键点

试剂一工作液配制时, 需要注意其溶质是否溶解完全。

操作步骤

- ① 标准管：取 30 μL 不同浓度标准品，加入对应的标准管中；
测定管：取 30 μL 待测样本，加入到对应的测定管中；
- ② 向步骤①中各管加入 120 μL 试剂五；
- ③ 涡旋混匀 5 s，3500 $\times g$ 离心 10 min；
- ④ 取③中各管 100 μL 上清，到新的标准管、测定管中；
- ⑤ 向④中各管加入 200 μL 试剂一工作液；
- ⑥ 涡旋混匀 5 s；
- ⑦ 向⑥中各管加入 100 μL 试剂三工作液；
- ⑧ 涡旋混匀 3 s，3500 $\times g$ 离心 10 min，取 300 μL 上清于酶标板中，酶标仪 650 nm 处测各孔 OD 值。

操作表

| | 标准管 | 测定管 |
|--|-----|-----|
| 不同浓度标准品(μL) | 30 | -- |
| 待测样本(μL) | -- | 30 |
| 试剂五(μL) | 120 | 120 |
| 涡旋混匀 5 s，3500 $\times g$ 离心 10 min，取 100 μL 上清待测。 | | |
| 上清(μL) | 100 | 100 |
| 试剂一工作液(μL) | 200 | 200 |
| 涡旋混匀 5 s。 | | |
| 试剂三工作液(μL) | 100 | 100 |
| 涡旋混匀 3 s，3500 $\times g$ 离心 10 min，取 300 μL 上清于酶标板中，酶标仪 650 nm 处测各孔 OD 值。 | | |

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

血清(浆)、尿液中总氨基酸含量计算公式：

$$\begin{aligned} \text{总氨基酸含量} \\ (\text{mmol/L}) \end{aligned} = (\Delta A_{650} - b) \div a \times f$$

组织中总氨基酸含量计算公式：

$$\begin{aligned} \text{总氨基酸含量} \\ (\text{mmol/gprot}) \end{aligned} = (\Delta A_{650} - b) \div a \times f \div C_{pr}$$

注解：

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

ΔA_{650} : 样本测定 OD 值-空白 OD 值

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} : 样本的蛋白浓度(gprot/L)

附录1 关键数据

1. 技术参数

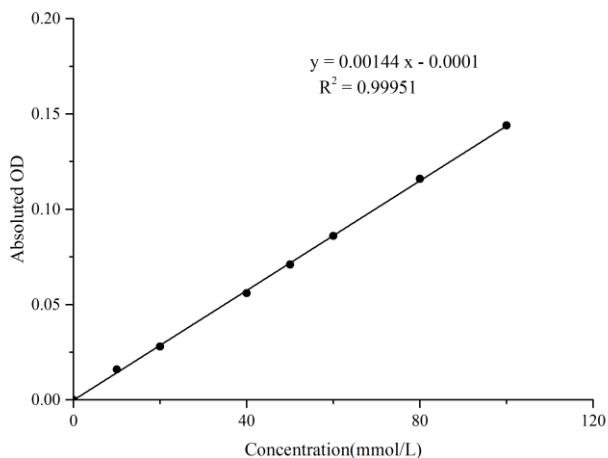
| | | | |
|-------|-----------------|-------|-------|
| 检测范围 | 3.64-100 mmol/L | 平均批间差 | 6.5 % |
| 灵敏度 | 3.03 mmol/L | 平均批内差 | 4.0 % |
| 平均回收率 | 102 % | | |

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 标准品浓度测定数据

| 标准品浓度 (mmol/L) | 0 | 10 | 20 | 40 | 50 | 60 | 80 | 100 |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| OD 值 | 0.072 | 0.087 | 0.099 | 0.126 | 0.140 | 0.156 | 0.185 | 0.214 |
| | 0.069 | 0.085 | 0.097 | 0.126 | 0.142 | 0.157 | 0.186 | 0.215 |
| 平均 OD 值 | 0.070 | 0.086 | 0.098 | 0.126 | 0.141 | 0.156 | 0.186 | 0.214 |
| 绝对 OD 值 | 0 | 0.016 | 0.028 | 0.056 | 0.071 | 0.086 | 0.116 | 0.144 |

② 数据作图(如下图)



附录2 实例分析

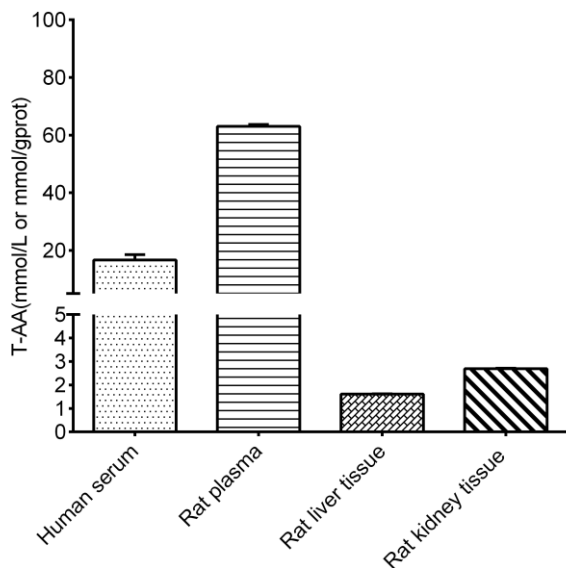
例如检测人尿液(数据仅供参考):

取30 μL 人尿液,按照说明书操作,结果如下。

标准曲线为 $y = 0.0014x - 0.0001$,测定孔平均OD值0.134,空白孔平均OD值0.070,计算结果为:

$$\text{总氨基酸含量} = (0.134 - 0.070 + 0.0001) \div 0.0014 = 45.79 \text{ mmol/L} \\ (\text{mmol/L})$$

按照说明书操作,测定人血清(加样量30 μL)、大鼠血浆(加样量30 μL)、大鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度9.17 gprot/L,加样量30 μL)、大鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白浓度7.56 gprot/L,加样量30 μL)中总氨基酸含量(如下图):



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Tseng S.Ja. An acid degradable, lactate oxidizing nanoparticle formulation for non-small cell lung cancer virotherapy[J]. *Nano Today*. IF:18.962
2. Salman T M, Iyanda M A, Alli-Oluwafuyi A M, et al. Telfairia occidentalis stimulates hepatic glycolysis and pyruvate production via insulin-dependent and insulin-independent mechanisms[J]. *Metabolism Open*, 2021, 10(1-10):100092. IF:8.694
3. Zhang Y, Wang Z, Shi B, et al. Effect of gingival mesenchymal stem cell-derived exosomes on inflammatory macrophages in a high-lipid microenvironment[J]. *International Immunopharmacology*, 2021, 94(9499):107455. IF:4.932
4. Alsayyah A, ElMazoudy R, Al-Namshan M, et al. Chronic neurodegeneration by aflatoxin B1 depends on alterations of brain enzyme activity and immunoexpression of astrocyte in male rats[J]. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2019, 182: 109407. IF:4.527
5. Faheem M. Synthesis and Biological Evaluation of Benzimidazole Derivatives as Potential Neuroprotective Agents in an Ethanol-Induced Rodent Model[J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2021, 12(3):489–505. IF:4.418
6. Ren F , Xu X , Xu J B , et al. Compound essential oils relieve oxidative stress caused by PM 2. 5 exposure by inhibiting autophagy through the AMPK / mTOR pathway[J]. *Environmental Toxicology*, 2021 Sep; 36(9):1765-1774. IF:4.119
7. Mohsin Alvi A, Tariq Al Kury L, Umar Ijaz M, et al. Post-Treatment of Synthetic Polyphenolic 1, 3, 4 Oxadiazole Compound A3, Attenuated Ischemic Stroke-Induced Neuroinflammation and Neurodegeneration[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(6): 816. IF:4.082
8. Darband S G, Sadighparvar S, Yousefi B, et al. Quercetin attenuated oxidative DNA damage through NRF2 signaling pathway in rats with DMH induced colon carcinogenesis[J]. *Life sciences*, 2020(253-). IF:3.708
9. Shah F A, Ali T, Khan A U. Potent Natural Antioxidant Carveol Attenuates MCAO-induced Oxidative stress, Neurodegeneration by Regulating the Nrf-2 pathway[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2020, 14: 659. IF:3.707
10. Amany Abdel-Rahman Mohamed , Safaa I. Khater , Ahmed Hamed Arisha , et al. Chitosan-stabilized selenium nanoparticles alleviate cardio-hepatic damage in type 2 diabetes mellitus model via regulation of caspase, Bax/Bcl-2, and Fas/FasL-pathway[J]. *Gene*, 2020, 768(7):145288. IF:3.688
11. Amany Abdel-Rahman Mohamed , Safaa I. Khater , Ahmed Hamed Arisha , et al.

- Chitosan-stabilized selenium nanoparticles alleviate cardio-hepatic damage in type 2 diabetes mellitus model via regulation of caspase, Bax/Bcl-2, and Fas/FasL-pathway[J]. *Gene*, 2020, 768(7):145288. IF:3.688
12. Yu H, Zhang L, Chen P, et al. Dietary bile acids enhance growth, and alleviate hepatic fibrosis induced by a high starch diet via AKT/FOXO1 and cAMP/AMPK/SREBP1 pathway in *Micropterus salmoides*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10. IF:3.367
 13. Li J, Ma X J, Wu X, et al. Adiponectin modulates steroid hormone secretion, granulosa cell proliferation and apoptosis via binding its receptors during hens' high laying period[J]. *Poultry Science*, 2021, 100(7): 101197. IF:3.352
 14. Fu H, Liu L, Tong Y, et al. The antidepressant effects of hesperidin on chronic unpredictable mild stress-induced mice[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2019. IF:3.04
 15. Guo Y, Liu C, Zhang J, et al. A relationship between MAPK/ERK pathway expression and neuronal apoptosis in rats with white matter lesions[J]. *European review for medical and pharmacological sciences*, 2020, 24(8): 4412-4419. IF:3.024
 16. Li L C , Dong S H , Li S H , et al. Downregulation of circular RNA circDOCK7 identified from diabetic rats after sleeve gastrectomy contributes to hepatocyte apoptosis through regulating miR-139-3p and MCM3[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 548:134-142. IF:2.985
 17. Kumar S, Ivanov S, Lagunin A, et al. Attenuation of Hyperhomocysteinemia Induced Vascular Dementia by Sodium Orthovanadate Perhaps via PTP1B: Pertinent Downstream Outcomes[J]. *Behavioural Brain Research*, 2019. IF:2.77
 18. Yin X, Zhao J, Jiang H, et al. Impact of Xenon on CLIC4 and Bcl-2 Expression in Lipopolysaccharide and Hypoxia-Ischemia-Induced Periventricular White Matter Damage[J]. *Neonatology*, 2018. IF:2.554
 19. Pan H Z, Zhang L J, Liu Y W, et al. Cold-inducible RNA binding protein agonist enhances the cardioprotective effect of UW solution during extended heart preservation[J]. *Artificial Organs*, 2020. IF:2.259
 20. Uysal N, Yuksel O, Kizildag S, et al. Regular Aerobic Exercise Correlates with Reduced Anxiety and Increased Levels of Irisin in Brain and White Adipose Tissue[J]. *Neuroscience Letters*, 2018. IF:2.173