天净沙系列

CAT#:7-SC2508-19-2-NH2

低温运输，-20℃保存

天净沙

# TNBSA 法游离氨基含量测定试剂盒

## TNBSA Method Free Amine Group Assay Kit

## 使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

## 产品及特点

本产品是基于 TNBSA 法开发的测定游离氨基 (Free Amine Group) 含量的试剂盒。其原理是游离氨基能与 TNBSA 在碱性条件下生成稳定的三硝基苯衍生物。由于该衍生物在 430 nm 处有特征光吸收，故通过监测在 430 nm 处的吸光度升高即可间接计算出游离氨基含量。本产品具有如下特点:

1. 即开即用，使用便捷，用户不需要优化条件，只需准备待测样本。
2. 灵敏度高，最低检测限为 33 μM。
3. 可以定量，线性范围在 100 μM-1 mM 之间。
4. 本产品足够 100 次 1 mL 体系的比色皿检测或 400 次 250 μL 体系的 96 孔板检测。
5. 本产品只可用于科研。

## 规格及成分

本产品采用小扁盒包装

| 成份 | 编号 | 规格 | 包装 |
|---|---|---|---|
| TNBSA 法游离氨基<br>含量测定反应液 | 7-SC2508-19-2-NH2r | 125 mL | 125 mL 本色瓶 |
| 10 mM L-赖氨酸溶液 | C56-87-1A | 1 mL | 1.5 mL 本色管 |
| TNBSA 法游离氨基<br>含量测定底物干粉 | 7-SC2508-19-2-NH2s | 100 T | 125 mL 本色瓶 |
| 使用手册 | sc7-SC2508-19-2-NH2 | 1 份 | 无 |

## 运输及保存

低温运输，-20℃保存，有效期一年。

## 自备试剂

待测样品，超纯水，比色皿或 96 孔板及与之匹配的分光光度计。

## 使用方法

**一、首次使用本试剂盒时配制下列溶液**

1. 配制 TNBSA 法游离氨基含量测定底物液：将 100 mL TNBSA 法游离氨基含量测定反应液加入到装有 TNBSA 法游离氨基含量测定底物干粉的瓶中，颠倒摇晃 20 次溶解，得 TNBSA 法游离氨基含量测定底物液，放冰上待用。
2. 如果一次实验没有用完上述溶液，需要放-20℃或更低温度保存。

**二、制备待测样本**

3. 用自备试剂制备待测样品，pH 控制在 8.0，由于此法易受样品中其他含氨基杂质的干扰，故实验时应严格控制反应时间和 pH。
4. 预留 10 mL 最后溶解样本的样本溶解液，作后续测光吸收时的阴性对照。

**三、标准曲线梯度稀释液的制备**

5. 每次测量都应制作标准曲线，下面以 6 个稀释度的标准曲线为例。
6. 标记 1-6 个 1.5 mL 离心管，每个管中加入 0.7 mL 超纯水。
7. 将第 1 步制备的 10 mM L-赖氨酸溶液为 1 号管样品。

8. 2 号管中加入 0.7 mL 在第 1 步制备的 1 mM L-赖氨酸溶液，充分震荡 1 分钟，得 5 mM L-赖氨酸溶液。放冰上待用。
9. 换枪头，在 3 号管中加入 0.7 mL 5 mM L-赖氨酸溶液（上步稀释所得），充分震荡 1 分钟，得 2.5 mM L-赖氨酸溶液。放冰上待用。
10. 重复上面的操作直到得到 10 mM、5 mM、2.5 mM、1.25 mM、625 μM、312.5 μM 共 6 个稀释度的样品。放冰上待用。

**三、标准曲线法 1 mL 体系比色皿测定**

11. 开机预热分光光度计并用超纯水调零后待用。
12. 设置反应。如果有 N 个待测样本，每个做 1 次重复，则需要设置 2N+6 个反应。在 2N+6 个 1.5 mL 离心管中按下表分别加入各成分：

| 成分 | 阴性对照管 | N 个<br>待测样本管 | 1-6 号标曲管 |
|---|---|---|---|
| TNBSA 法游离氨基<br>含量测定底物液 | 900 μL | 900 μL | 各 900 μL |
| 自备样本溶解液 | 100 μL | 不加 | 不加 |
| 标曲梯度液 | 不加 | 100 μL | 不加 |
| N 个待测样本 | 不加 | 不加 | 各 100 μL |
| 涡旋振荡 30 秒混匀，室温静置 30 分钟 | | | |

13. 迅速使用分光光度计测定每个样本在 430 nm 的光吸收读数，测前用超纯水调零，共得 N+7 个读数。

**四、数据处理**

14. 计算真实 OD430 光吸收：每个样本测得的光吸收减去阴性对照的光吸收即为每个样本的光吸收。共 N+6 个读数。
15. 制备标准曲线：以 L-赖氨酸溶液的浓度为横轴，以其真实 OD430 光吸收为纵轴，绘制标准曲线。
16. 将 N 个待测样品的 OD430 值带入标准曲线方程，即可计算出每个待测样品中的游离氨基的浓度。

**五、96 孔板检测**

17. 操作同上，只是在设置反应时，各成分的用量降低 75%，只用 25%，计算时体积不是 1 mL，而是 0.25 mL。同时光径不是 1 cm，要根据所用 96 孔板修改（需要咨询厂家）

**关联产品**

O-糖苷键偶联的 N-乙酰氨基单糖比色法测定试剂盒（DMAB 法）