

QG AQC-Tag 氨基酸分析试剂盒 使用说明书v1.0

■ 1.AQC-Tag 方法简介

本手册介绍 QG AQC-Tag 氨基酸分析方法。

AQC-Tag 方法是一种用于肽和蛋白质水解氨基酸分析的柱前衍生技术。

AQC-Tag 方法包括：

- 使用 QG AQC-Tag 反应试剂衍生氨基酸
- 使用反相色谱分离衍生物
- 使用荧光或紫外检测定量衍生物

AQC-Tag 方法特点：

- 精确度高
- 灵敏度可达 pmol 级
- 易于操作

QG AQC-Tag 氨基酸分析试剂盒（货号T80421）专为 QG AQC-Tag 氨基酸分析系统作了全面优化。其他系统也许不能达到同样的分析效果。

AQC-Tag 氨基酸分析试剂盒组分

名称	规格	支数	储存条件
标记缓冲液 Labeling Buffer（1）	4mL/支	1	2~8℃
衍生剂粉末 Reagent Powder（2A）	2.5mg/支	1	2~8℃
衍生剂稀释液 Reagent Diluent（2B）	2mL/支	1	2~8℃
水解氨基酸标准样品 Amino Acid Hydrolysis Standard Sample（3）	100μL/支	1	2~8℃

规格：50测试/盒。

注：标记缓冲液析出属正常现象，使用前提前恢复室温或加热或超声助溶，完全溶解后再使用。

1.1 衍生化学简介

AQC-Tag 方法的基础在于专为氨基酸分析而开发的衍生试剂。QG AQC-Tag衍生试剂（6-氨基喹啉基-N-羧基琥珀酰亚氨基甲酸酯 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate，即AQC）是含N-羧基琥珀酰亚氨基的活性杂环氨基甲酸酯，它是一种新型氨基衍生化合物，结构如下(图1-1)。

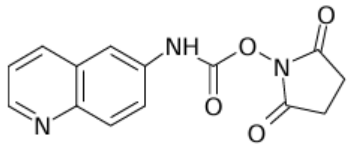


图1-1 QG AQC-Tag衍生试剂

衍生剂

AQC-Tag衍生剂化学性质：

- 可将含伯氨基和仲氨基的化合物转化为稳定的荧光衍生物
- 可水解生成 6-氨基喹啉：一种不干扰测定的副产物

氨基酸衍生反应

AQC-Tag 衍生剂与伯氨基酸和仲氨基酸迅速反应，生成在 395nm 发射强荧光的高稳定性的脲（图1-2），生成的衍生物在室温下可稳定一周。

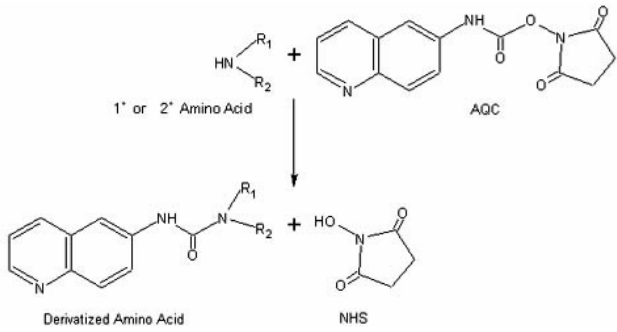


图1-2 AQC-Tag 衍生反应

试剂水解

过量的衍生试剂水解生成 6-氨基喹啉（AMQ），N-羧基琥珀酰亚氨（NHS）和二氧化碳（图1-3），可在1分钟内水解完全。主要的水解产物AMQ在395nm的荧光很弱，在色谱图上只产生一个易于辨认的小峰。NHS和二氧化碳对分析没有干扰。

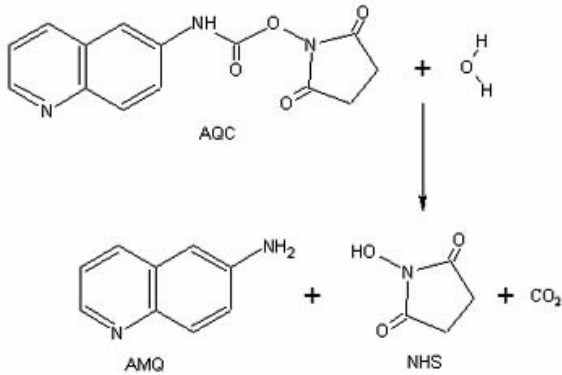


图1-3 AQC-Tag 水解反应

1.2 AQC-Tag 氨基酸分析

- QG AQC-Tag 氨基酸分析试剂盒可用于分析50个水解氨基酸样品。
- QXG-AAA 氨基酸分析柱（货号T80804-504625）：用于分离用 AQC-Tag 衍生剂衍生的氨基酸。该色谱柱是经特别检验筛选出的 5μm 高效C18柱，是 AQC-Tag 方法的专用柱。
- QG AQC-Tag Eluent A 浓缩液（500mL）：10×预混合好的浓缓冲液，使用时用纯化水稀释至1×。

■ 2.配制 AQC-Tag 衍生剂

AQC-Tag 试剂盒中装有称量好的衍生剂粉末（并经过检测确保仅含最低限度的氨基酸染物），准备好AQC-Tag 衍生试剂。

配制方法如下：

1. 将加热装置预热至 55℃。

2. 在打开 2A 瓶之前，轻轻敲击，确保所有的 AQC-Tag 试剂粉全部落在瓶底。
3. 由 2B 瓶中吸取 1mL AQC-Tag 稀释剂并弃去，以清洗微量移液管。注意：乙腈是易燃、有毒的化学试剂，使用时注意安全防护措施。
4. 吸取 1mL AQC-Tag 稀释剂放入装有 AQC-Tag 衍生剂粉末的 2A 瓶中，加盖密封。
5. 旋涡震荡 30 秒钟。
6. 在加热装置上加热 2A 瓶，直至 AQC-Tag 衍生剂粉末全部溶解。加热时间不超过10 分钟。

保存：

AQC-Tag 试剂能与环境湿气反应，配制好的 AQC-Tag 试剂在干燥器中于室温下保存一周，或密封后于-20℃可保存 3 个月。

■ 3.制备校正标样

本章详述外标和内标校正曲线法所用标样的制备方法，以及衍生这些标样的方法。

用校正标样可以计算：

- 水解样品中肽、蛋白质的组成
- 水解样品中每种氨基酸的摩尔含量
- 绝对进样量

制备校正标样需用下列器具：

- 可调微量移液器（20μL，200μL 和 2000μL）和吸液头
- 涡旋混合器
- 自动进样瓶
- 9-英寸巴斯德移液管
- 加热装置

3.1 制备外标法校正标样

QG AQC-Tag 氨基酸分析试剂盒包括 QG 氨基酸水解标样，标样中含 2.5mM 的各种水解氨基酸（除胱氨酸为1.25mM 外）。确保所有的玻璃仪器都是清洁的。对于高灵敏度的分析，全部玻璃容器都应在 500℃至少热解 4 小时。

制备标样：

取 40μL水解氨基酸标样置于清洁的自动进样瓶中，加入 960μL 超纯水（18MΩ），混匀。

此校正标样中含各种氨基酸均为 100 pmol/μL(含胱氨酸为 50 pmol/μL，相当于含半胱氨酸 100 pmol/μL)。

储存：

此校正标样在-20℃可保存 1 个月。

剩余的水解氨基酸标样（密封）在-20℃可保存 3 个月。

未开封的水解氨基酸标样安瓿瓶在 4℃可保存 1 年。

3.2 制备内标法校正标样

在样品中加入内标物（可选）可以修正制备样品时带来的体积误差。内标物应当是一个保留时间已知且不与其它峰重叠的稳定的氨基酸，α-氨基丁酸是首选的内标物，另一个可供选择的内标物是正亮氨酸。

制备内标储备液

内标储备液的作用：

- 用内标物校正标样
- 加入内标物到样品中（参见 4.3 小节，衍生样品）

称量 6.45mg α-氨基丁酸，溶于 25mL 0.1M HCl 中，即为2.5mM 的内标储备液。

储存：

此内标储备液在-20℃可保存 6 个月。

制备含内标物的校正标样：

在清洁的自动进样瓶中加入 40μL 内标储备液、40μL 水解氨基酸标样和 920μL 超纯水（18MΩ）水，混匀。

此含内标物的校正标样中含各种氨基酸均为 100 pmol/μL（含胱氨酸为 50 pmol/μL，相当于含半胱氨酸 100 pmol/μL）。

储存：

含内标的校正标样在-20℃可保存 1 个月。

3.3 衍生校正标样

衍生反应将标样中的氨基酸转化为稳定的 AQC 衍生物，衍生方法如下（图3-1）：

衍生方法：

1. 将加热装置预热至 55℃。
2. 用清洁的注射器移取 10μL 校正标样注入清洁的样品管底部。
3. 用微量移液器加入 70μL AQC-Tag 标记缓冲液到样品管中，涡旋混合。
4. 用另一清洁的微量移液器吸液头加入 20μL AQC-Tag 衍生剂到样品管中，立即涡旋混合10~30秒钟。
5. 在室温下放置 1 分钟。
6. 用一支 9 英寸巴斯德移液管将样品管中的溶液转移到微量自动进样瓶中，盖好。
7. 将进样瓶在加热装置上于 55℃加热 10 分钟。
8. 冷却后即可进样分析。

加热的目的是将衍生酪氨酸时的副产物转化为单一的主产物。在室温下此转化反应较缓慢，其半衰期约 1 小时。

每 5μL 此衍生标样含 50pmol 每种氨基酸衍生物（胱氨酸为25pmol）。

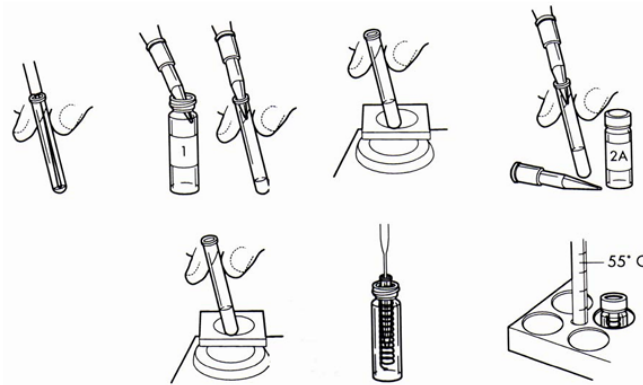


图3-1 衍生校正标样

储存:

此衍生标样在室温下可保存 1 周。

■ 4.样品制备

制备用于 AQC-Tag 方法测定的氨基酸样品：

- 测算样品用量
- 将样品水解成氨基酸组分
- 用 AQC-Tag 衍生剂衍生氨基酸

对于氨基酸污染来说，样品制备方法是关键。尽量减小背景污染的有关要点列于 4.2 节水解样品的末尾。

4.1 测算样品用量

表 4-1 列出用 AQC-Tag 方法水解和分析的样品用量

表 4-1 样品用量表

样品	样品用量*	
蛋白质	0.1~5.0 µg	4~200 pmol
多肽	0.02~1.0 µg	20~1000 pmol

*注：基于蛋白质平均分子量＝25,000，多肽平均分子量＝1,000。

4.2 水解样品

对于多数蛋白质来说，气体酸水解是最有效的水解方法，这是一种避免来自水解用酸污染的最佳方法。

水解样品:

1. 在清洁的样品管中真空干燥样品溶液。
2. 加 200µL恒沸盐酸至反应瓶的底部，往酸中加入苯酚晶体。
3. 用真空-氮气吹扫反应瓶三次，以排除瓶中的空气。
4. 用瓶塞密封瓶子。
5. 在 112~116℃水解 20~24 小时。
6. 冷却反应瓶，小心打开瓶塞，擦去样品管外过量的盐酸，并在真空下干燥。

背景污染:

背景污染能轻易地给每个样品带入 10pmol 以上的某些氨基酸污染，特别是 Ser （丝氨酸）和 Gly（甘氨酸）。

可能的污染来源是：

- 不洁的玻璃容器
- 实验室中的生物
- 抽烟产生的烟雾
- 空气中的灰尘
- 手指
- 滑石粉

最大限度地减小背景污染:

为了达到最好效果，您应该：

- 用注射器将样品注入样品管的底部。
- 用锉刀或玻璃刀给样品管做标记。
- 防止盐酸液滴从排出口滴入样品管中，保持样品管在反应瓶中口朝上。
- 在 500℃热解所有的样品管和反应瓶 4 小时。

- 采用气体酸水解方法；用恒沸盐酸（6N）。
- 用清洁无滑石粉的手套和清洁的镊子。
- 用空白衍生和适当的对照物检验背景污染。
- 用一个空样品管做对照水解空白。
- 要警觉来自随意使用的吸液头、注射器和镊子的潜在污染，注意防止来自校正标样和样品的交叉污染。
- 邻近操作的普通生化仪器也可能带来背景污染。

4.3 衍生样品

衍生是指将样品中的氨基酸转化为稳定的氨基酸衍生物。本节叙述水解样品的制备和衍生方法。

制备水解样品:

1. 制备 20mM 的盐酸溶液：在清洁的自动进样瓶中加入10µL 恒沸盐酸（6N），加 3mL 超纯水（18MΩ），混匀。
2. 将 20µL 上述 20mM 的盐酸溶液加入水解样品中。
3. 涡旋混合。

制备含内标物的水解样品:

1. 制备 20mM 的盐酸溶液：在清洁的自动进样瓶中加入 10µL 恒沸盐酸（6N），加 3mL 超纯水（18MΩ），混匀。
2. 制备内标溶液：取 20µL 内标储备液，加入到 980µL 20mM 的盐酸溶液中，混合均匀。
3. 将 20µL 上述内标溶液加入水解样品中。
4. 涡旋混合。

储存:

将内标溶液储存于带自密封隔膜盖的自动进样瓶中，在-20℃下可保存 1 个月。

衍生样品:

1. 将加热装置预热到 55℃。
2. 用清洁的注射器移取 10µL 水解样品注入清洁的样品管底部。
3. 加入 70µL AQC-Tag 标记缓冲液到样品管中，涡旋混合。
4. 上述样品管中加入 20µL AQC-Tag 衍生试剂,立即涡旋混合数秒钟（在制备较多样品时，每管加入20µL AQC-Tag 衍生试剂后即立刻混匀，而非等所有样品加完后一起混匀）。
5. 放置 1 分钟，使过量的衍生剂水解为 AMQ，衍生反应结束。
6. 将样品管中的反应物转移到微量自动进样瓶中，加盖密封。
7. 将进样瓶在加热装置上于 55℃加热 10 分钟。
8. 冷却后即可进样。

加热的目的是将衍生酪氨酸时的副产物转化为单一的主产物，在室温下此转化反应较缓慢。

衍生空白样:

确保所有的玻璃容器都是清洁的，所用的样品管在 500℃至少热解 4 小时。

1. 在样品管中加入 80µL AQC-Tag 标记缓冲液。

2. 加入 20µL AQC-Tag 衍生试剂，涡旋混合。
3. 放置 1 分钟，使过量的衍生剂水解为 AMQ。
4. 将样品管中的反应物转移到微量自动进样瓶中，加盖密封。

衍生空白样无需加热。

■ 5.分离氨基酸衍生物

本章描述分离 AQC-Tag 氨基酸衍生物所需的色谱参数。为了确保最佳分离效果，应特别注意洗脱液的组成和输送量的准确。

5.1 设置检测器

QG AQC-Tag 氨基酸分析方法可以使用紫外检测器，也可以使用荧光检测器，若使用紫外检测器，检测波长设置为260nm，若使用荧光检测器，请用下表5-1检测器参数。

表 5-1 设置扫描荧光检测器

激发波长	266 nm
发射波长	473 nm
滤波	0.5
增益	100

5.2 准备洗脱液和梯度表

试剂盒中的试剂已被精心地调配到对QG AQC-Tag 氨基酸分析系统的最佳性能。其它系统可能达不到同样水平的分离效果。

制备 AQC-Tag 洗脱液 A:

AQC-Tag 洗脱液 A 是甲酸-甲酸铵缓冲液。由 AQC-Tag Eluent A 浓缩液制备。AQC-Tag 洗脱液 A，只需加 200mL 浓缩液到 1.8L超纯水（18MΩ）中并混合均匀即可。

储存:

在 4℃，加盖的 AQC-Tag 洗脱液 A 可保存 1 个月。

洗脱液:

- 洗脱液 A—QG AQC-Tag 洗脱液 A
- 洗脱液 B—0.1% 甲酸-乙腈溶液。为尽量减少污染，只能使用 HPLC 级的乙腈。

注意：乙腈是易燃、有毒的化学试剂。使用时注意安全防护措施。

储存:

在 4℃，加盖的洗脱液 B 可保存 1 个月。

启动和平衡HPLC系统:

1. 设定柱温 45℃。
2. 用洗脱液 B 以 1mL/min 流速平衡 QG AQC-Tag 色谱柱 5 分钟。
3. 用 95% 洗脱液 A 以 1mL/min 流速平衡色谱柱 9 分钟。保留时间的重现性对于正确的峰检测是至关重要的。应当总是用同样的平衡时间来平衡色谱柱。在每次分析之前运行一次空白梯度以检验基线性能。

梯度表:

请用表 5-2 所列的梯度表。

表 5-2 HPLC系统适用的梯度表

Time (min)	Flow Rate (mL/min)	%A	%B
	1.0	95	5
1.0	1.0	95	5
25.0	1.0	90	10
40.0	1.0	80	20
50.0	1.0	72	28
51.0	1.0	20	80
55.0	1.0	20	80
56.0	1.0	95	5
65.0	1.0	95	5

运行时间:

整个分离的运行时间为50分钟，50-55分钟会停留在B相进行洗脱，而55分钟后整个色谱条件会返回色谱柱平衡状态。

5.3 进样量准则

表 5-3 提供了基于样品水解和衍生量的进样量参考标准。

表 5-3 进样量标准

样品	计算样品量*	进样量
蛋白质	0.1~1.0 µg 4~40 pmol	10~20 µL
	1.0~5.0 µg 4~200 pmol	5~10 µL
多肽	0.02~0.20 µg 20~200 pmol	10~20 µL
	0.20~1.0 µg 200~1000 pmol	5~10 µL
标样	50 pmol	5 µL

*注：基于蛋白质平均分子量＝25,000，多肽平均分子量＝1,000。

5.4 评价校正标样的分离情况

你的 AQC-Tag 氨基酸分析应当得到如图 5-1 所示的色谱图，检验分析结果的一个好办法是检验特殊峰对，下述 4 个峰对的分辨率应大于 90%：（Arg/Thr，Cys/Tyr，Val/Met，Ile/Leu）

图 5-1 是用 AQC-Tag 方法分析的色谱图，样品为 1.25 µmol/mL氨基酸标样，检测器为紫外检测器（波长260nm），进样量为 5 µL。

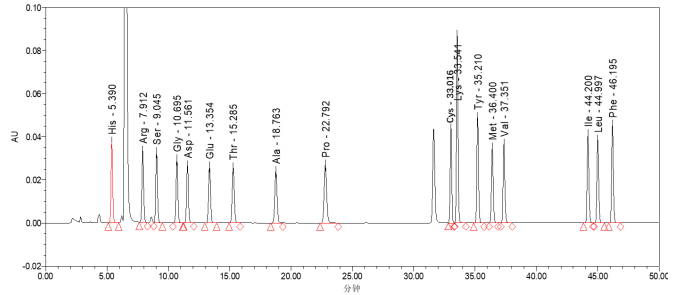


图 5-1 1.25 µmol/mL标样图谱