（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-K847-M

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(440-460 nm)

Elabscience®支链氨基酸（BCAA）比色法测试盒

Branched Chain Amino Acids (BCAA) 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

本试剂盒适用于检测血清(浆)、动植物组织、细胞样本中的支链氨基酸(BCAA)的含量。

检测原理

支链氨基酸(Branched Chain Amino Acids, BCAA)包括亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸，作为人体的必需氨基酸，具有肌肉合成、抗蛋白分解和刺激胰岛素产生的作用。

本测试盒检测原理为：支链氨基酸在酶的催化下生成的产物与显色剂反应生成显色物质，该物质在 450 nm 处有最大吸收，通过测定 450 nm 处的 OD 值大小和标准曲线计算样本中 BCAA 含量。

本试剂盒检测组织与细胞样本时，需要测定蛋白浓度。动物组织与细胞样本推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)；植物组织样本推荐使用考马斯亮蓝法(货号：E-BC-K168-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)	缓冲液 (Buffer Solution)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20℃避光保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×2 支	粉剂×4 支	-20℃避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	辅酶 (Coenzyme)	粉剂×2 支	粉剂×4 支	-20℃避光保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	3 mL×1 瓶	6 mL×1 瓶	-20℃避光保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	50 mmol/L 标准品溶液 (50 mmol/L Standard Solution)	0.5 mL×1 支	1 mL×1 支	-20℃避光保存 6 个月
	酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	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(440-460 nm，最佳检测波长 450 nm)、恒温箱

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温(25 ℃)。

② 试剂二工作液的配制：

取一支试剂二粉剂用275 μL双蒸水溶解混匀，未使用完的试剂二工作液可-20 ℃避光保存7天。

③ 试剂三工作液的配制：

取一支试剂三粉剂用1375 μL试剂一溶解混匀(若试剂三难溶，可以40 ℃超声溶解5 min)，未使用完的试剂三工作液可-20 ℃避光保存7天。

④ 反应工作液的配制：

将试剂二工作液：试剂三工作液按2：25体积比混匀，避光待用，现配现用，当天使用有效。

⑤ 2 mmol/L标准品配制：

将试剂五：双蒸水按1：24体积比稀释，未用完的2 mmol/L标准品可-20 ℃避光保存三个月。

⑥ 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**	**0.2**	**0.4**	**0.6**	**0.8**	**1.2**	**1.6**	**2**
2 mmol/L 标准品(μL)	0	10	20	30	40	60	80	100
双蒸水(μL)	100	90	80	70	60	40	20	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本：直接检测。

组织样本：按组织样本质量(g)：生理盐水(0.9% NaCl) (mL) = 1：9的比例进行匀浆，例如：0.1 g组织，加入0.9 mL生理盐水(0.9% NaCl)匀浆。4 ℃，10000 ×g离心10 min，取上清液置于冰上待测，当天检测有效。留取部分上清用于蛋白浓度测定。

细胞样本：取1×10^6个细胞加入200 μL生理盐水(0.9% NaCl)进行匀浆，4 ℃，10000 ×g离心10 min，取上清液置于冰上待测，当天检测有效。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：0.009-2 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%小鼠肝组织	5-10
10%小鼠肾组织	5-10	10%小鼠心组织	5-10
10%小鼠脑组织	不稀释	10%小鼠脾组织	不稀释
1×10^6 个 Jurkat 细胞	不稀释	1×10^6 个 HL-60 细胞	不稀释

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

操作步骤

① 标准孔:取 10 μL 不同浓度的标准品溶液,分别加入相应的酶标孔中。
测定孔：取 10 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。

② 向步骤①中的各孔中加入 50 μL 反应工作液。

③ 向步骤②中的各孔中加入 50 μL 试剂四。

④ 振板 5 s，37 ℃ 孵育 30 min，酶标仪 450 nm 波长下测定各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	10	--
待测样本(μL)	--	10
反应工作液(μL)	50	50
试剂四(μL)	50	50
振板 5 s，37 ℃ 孵育 30 min，酶标仪 450 nm 波长下测定各孔 OD 值。		

本试剂盒检测组织与细胞样本时，需要测定蛋白浓度。动物组织与细胞样本推荐使用 BCA 法(货号：E-BC-K318-M)；植物组织样本推荐使用考马斯亮蓝法(货号：E-BC-K168-M)。

结果计算

标准品拟合曲线：y = ax + b

血浆(清)样本中支链氨基酸(BCAA)含量计算公式：

$$\text{BCAA 含量 (mmol/L)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \times f$$

组织与细胞样本中支链氨基酸(BCAA)含量计算公式：

$$\text{BCAA 含量 (mmol/gprot)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div C_{pr} \times f$$

注解：

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

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

ΔA_{450}：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}：待测样本的蛋白浓度，gprot/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

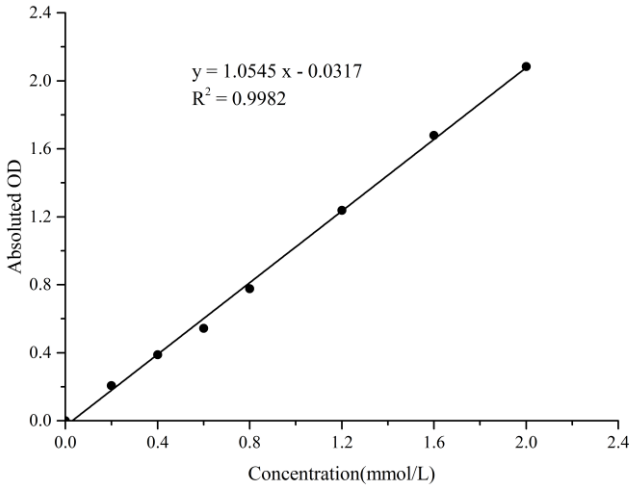
检测范围	0.009-2 mmol/L	**批间差**	3.4-8.5%
灵敏度	0.009 mmol/L	**批内差**	0.6-1.0%
加标回收率	94-104%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量10 μL，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	**0**	**0.2**	**0.4**	**0.6**	**0.8**	**1.2**	**1.6**	**2**
OD 值	0.122	0.327	0.513	0.675	0.894	1.354	1.804	2.203
	0.124	0.331	0.511	0.657	0.905	1.368	1.801	2.211
平均 OD 值	0.123	0.329	0.512	0.666	0.890	1.361	1.803	2.207
绝对 OD 值	0	0.206	0.389	0.543	0.777	1.238	1.680	2.084

② 绘制标曲(如下图)：



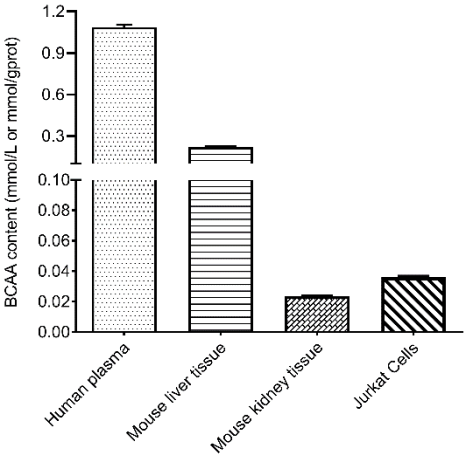
附录2 实例分析

例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考):

取 10 μL 稀释 5 倍的 10%小鼠肝组织样本匀浆上清，按操作表操作，结果如下：标准曲线：y =1.0545 x - 0.0317，空白孔 OD 值为 0.121，测定孔 OD 值为 0.564，ΔA_{450} = 0.564 - 0.121 = 0.443，10%小鼠肝组织匀浆样本蛋白浓度为 10.12 gprot/L，计算结果为：

BCAA含量(mmol/gprot) = (0.443 + 0.0317) ÷ 1.0545 ÷10.12 ×5 = 0.222 mmol/gprot

按照说明书操作，测定人血浆（稀释10倍，加样量10 μL）、小鼠肝组织（10%组织匀浆蛋白浓度为10.12 gprot/L，稀释5倍，加样量10 μL）、小鼠肾组织（10%组织匀浆蛋白浓度为8.02 gprot/L，稀释5倍，加样量10 μL）、Jurkat细胞（2×10^6个蛋白浓度为1.02 gprot/L，加样量10 μL）中支链氨基酸含量如下图：



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。