（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-K839-M

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：酶标仪(450 nm)

Elabscience®丙氨酸（Ala）比色法测试盒

Alanine (Ala) 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)、动物组织、细胞样本中丙氨酸（Ala）含量。

检测原理

丙氨酸（Alanine，Ala）是组成蛋白质的 20 种基本氨基酸之一，是非必需氨基酸。Ala 在人体血液中含量很高，在葡萄糖-丙氨酸循环等人体代谢活动中发挥重要作用，也可以帮助神经系统传导，对维持人体健康具有重要的作用。

本试剂盒的检测原理为：丙氨酸被酶分解，生成 NADH，NADH 在电子传递体催化下与 WST-8 生成显色物质，在波长 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 Ala 含量。

提供试剂和物品

编号	名称	规格(Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	11 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	辅酶 A (Coenzyme A)	0.22 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	辅酶 B (Coenzyme B)	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶试剂 A (Enzyme Reagent A)	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	酶试剂 B (Enzyme Reagent B)	1.32 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	显色剂 (Chromogenic Agent)	11 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	10 mmol/L 标准品 (10 mmol/L Standard)	0.2 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	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

耗材：10 KD 超滤管

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)

试剂准备

① 检测前，所有试剂需平衡至25°C。

② 试剂三工作液的配制：

取一支试剂三用220 μL双蒸水溶解得到试剂三工作液，未用完的试剂三工作液可-20°C避光保存一周。

③ 酶反应液的配制：

取一支试剂四用275 μL双蒸水溶解，得到试剂四工作液，现配现用，当天有效。将试剂四工作液：试剂五按5：12体积比混匀，得到酶反应液，现配现用，当天有效。(试剂四工作液试剂会沉底，取试剂四工作液前先混匀）。

④ 试剂五工作液的配制：

将试剂五：双蒸水按12：5体积比混匀，现配现用，当天有效。

⑤ 反应工作液的配制：

将试剂一：试剂二：试剂三工作液：试剂六按50：1：2：50体积比混匀，得到反应工作液。按需配制，现配现用，半小时内使用有效。

⑥ 500 μmol/L标准品的配制：

将10 mmol/L标准品：双蒸水按1：19体积比稀释，未用完的500 μmol/L标准品可-20°C避光保存三个月。

⑦ 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(μmol/L)	**0**	**25**	**50**	**100**	**200**	**300**	**400**	**500**
500 μmol/L 标准品(μL)	0	10	20	40	80	120	160	200
双蒸水(μL)	200	190	180	160	120	80	40	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本：取血清(浆)于10 KD超滤管中超滤，4°C，12000 × g，离心25 min，取外管中的滤出液置于冰盒上待测。

组织样本：按照组织样本质量(g)：生理盐水(0.9% NaCl)体积(mL) = 1:9的比例匀浆(如0.1 g组织样本，加入0.9 mL生理盐水(0.9% NaCl))。4°C，10000 × g，离心10 min，取上清于10 KD超滤管中超滤，4°C，12000 × g，离心25 min，取外管中的滤出液置于冰盒上待测。

细胞样本：取 1×10^6 个细胞加入 300 μL 生理盐水(0.9% NaCl)进行匀浆，4°C，10000 × g，离心 10 min，取上清于 10 KD 超滤管中超滤，4°C，12000 × g，离心 25 min，取外管中的滤出液置于冰盒上待测。

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：10.65-500 μmol/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	3-10	豚鼠血浆	2-10
小鼠血清	2-10	猪血清	2-10
10%小鼠肝组织	3-10	10%小鼠肾组织	2-10
1×10^6 个 Hela 细胞	不稀释	1×10^6 个 Jurkat 细胞	不稀释
1×10^6 个 RAW264.7 细胞	不稀释	1×10^6 个 293T 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 20 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、对照孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。

① 向步骤①中的标准孔和测定孔中加入 17 μL 酶反应液，向步骤①中的对照孔中加入 17 μL 试剂五工作液。

③ 向步骤②中的各孔中加入 200 μL 反应工作液。

④ 37°C 避光孵育 30 min，酶标仪 450 nm 处检测各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度标准品(μL)	20	--	--
待测样本(μL)	--	20	20
酶反应液(μL)	17	17	--
试剂五工作液(μL)	--	--	17
反应工作液(μL)	200	200	200
37°C 避光孵育 30 min，酶标仪 450 nm 处检测各孔 OD 值			

结果计算

标准品拟合曲线： $y = a x + b$

血清(浆)等液体样本中丙氨酸(ALa)含量计算公式：

$$\text{ALa 含量 (μmol/L)} = \frac{\Delta A - b}{a} \times f$$

组织样本中丙氨酸(ALa)含量计算公式：

$$\text{ALa 含量 (μmol/kg wet weight)} = \frac{\Delta A - b}{a} \times V \div m \times f$$

细胞样本中丙氨酸(ALa)含量计算公式：

$$\text{ALa 含量 (nmol/10^6)} = \frac{\Delta A - b}{a} \times V \div n \times f$$

注解：

y：标准孔 OD 值-空白孔 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：测定孔 OD 值-对照孔 OD 值

V：样本匀浆时加入的生理盐水(0.9%NaCl)体积，mL

m：样本质量，g

n：细胞样本的数量，10^6 个

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

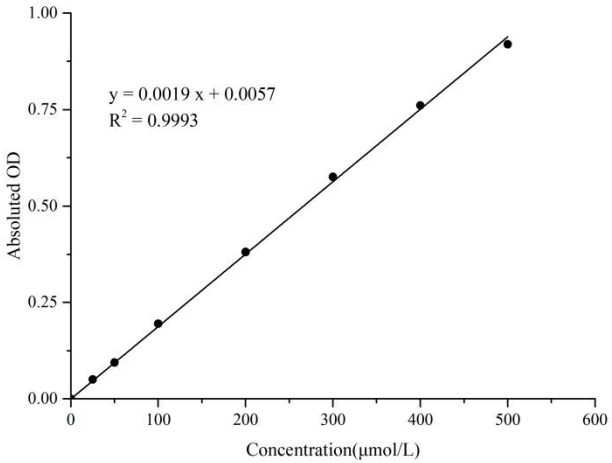
检测范围	10.65-500 μmol/L	批间差	4.8-8.4%
灵敏度	10.65 μmol/L	批内差	2.2-2.8%
加标回收率	102-105%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度的标准品加样量为20 μL，按照操作表进行操作记录OD值，结果如下：

标准品浓度（μmol/L）	0	25	50	100	200	300	400	500
OD 值	0.172	0.221	0.269	0.369	0.551	0.745	0.941	1.131
	0.172	0.224	0.264	0.365	0.555	0.751	0.925	1.053
平均 OD 值	0.172	0.223	0.267	0.367	0.553	0.748	0.933	1.092
绝对 OD 值	0.000	0.051	0.095	0.195	0.381	0.576	0.761	0.920

② 绘制标准曲线，如下图所示：



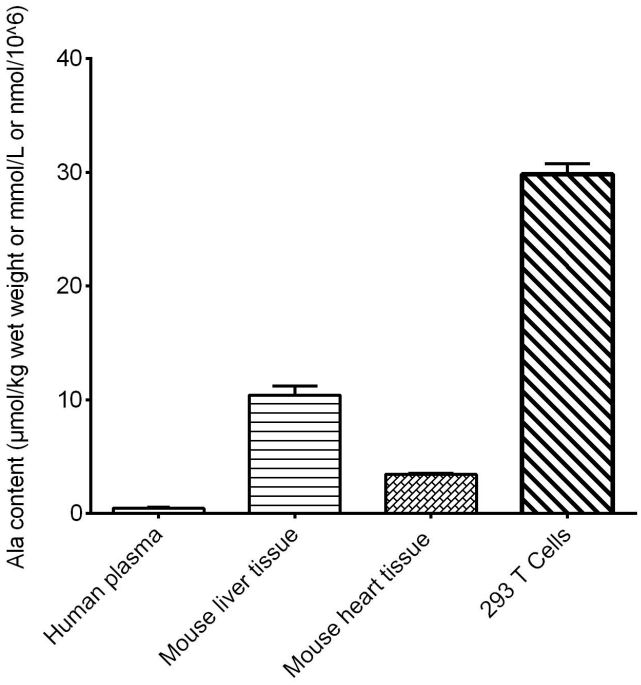
附录2 实例分析

例如检测人血浆(数据仅供参考)：

取 20 μL 稀释 5 倍的人血浆样本，按操作表操作，结果如下：标准曲线 y = 0.0019 x + 0.0057，测定孔 OD 值为 0.376，对照孔 OD 值为 0.202，计算结果为：

丙氨酸含量(μmol/L) = (0.376 - 0.202 - 0.0057) ÷ 0.0019 × 5 = 442.89 μmol/L

按照说明书操作，测定人血浆(稀释 5 倍，加样量 20 μL)、小鼠肝组织(稀释 10 倍，加样量 20 μL)、小鼠心组织 (稀释 10 倍，加样量 20 μL)、293 T 细胞(1.8×10^6 个，加样量 20 μL)中 Ala 的含量(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。