

(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-K849-M

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(440-465 nm)

Elabscience®天冬氨酸(Asp)比色法测试盒

Aspartate (Asp) 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)、动物组织及细胞样本中的天冬氨酸含量。

检测原理

L-天冬氨酸(L-aspartate)是一种 α -氨基酸,它与谷氨酸同为酸性氨基酸。它属于人体内非必需氨基酸的一种。本试剂盒的检测原理是酶催化天冬氨酸和底物产生谷氨酸,谷氨酸进一步在酶的催化下生成的产物在电子耦合剂的作用下将显色剂还原生成橙黄色产物,在450 nm左右检测有最大吸收峰。

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)	55 mL×1 瓶	-20°C 保存6个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	0.5 mL×1 支	-20°C 避光 保存6个月
试剂三 (Reagent 3)	催化剂 (Catalyst)	0.48 mL×2 支	-20°C 避光 保存6个月
试剂四 (Reagent 4)	酶试剂 (Enzymatic Reagent)	0.48 mL×2 支	-20°C 避光 保存6个月
试剂五 (Reagent 5)	氧化剂 (Oxidant Reagent)	粉剂×2 瓶	-20°C 避光 保存6个月
试剂六 (Reagent 6)	显色剂 (Chromogenic Agent)	5 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存6个月
试剂七 (Reagent 7)	促进剂 (Accelerant)	0.5 mL×1 支	-20°C 避光 保存6个月
试剂八 (Reagent 8)	500 μ mol/L 标准品溶液 (500 μ mol/L Standard Solution)	5 mL×1 瓶	-20°C 避光 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(440-465 nm，最佳检测波长 450 nm)、37°C 恒温箱

耗材：3KD 超滤管（规格 1.5 mL 外管，0.5 mL 内管）

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂五工作液的配制：

取一瓶试剂五，加入2.5 mL双蒸水，混匀至完全溶解，未使用完可在-20°C避光保存3天。

③ 测定工作液的配制：

将试剂一:试剂二:试剂三:试剂四:试剂五工作液:试剂七按体积比=353 : 5 : 20 : 20 : 100 : 2配制，置于冰上避光待用，现配现用，按需配制。

④ 对照工作液的配制：

将试剂一:试剂四:试剂五工作液:试剂七按体积比=189 : 10 : 50 : 1配制，置于冰上避光待用，现配现用，按需配制。

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 ($\mu\text{mol/L}$)	0	100	150	200	300	350	400	500
500 $\mu\text{mol/L}$ 标准品 (μL)	0	40	60	80	120	140	160	200
试剂一 (μL)	200	160	140	120	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本: 取100-500 μL , 加入到3KD超滤管, $12000 \times g$ 离心10 min, 取滤出液收集管中的滤出液待测。

组织样本: 按照组织样本质量(g): 试剂一体积(mL)=1: 9的比例匀浆, 4°C , $10000 \times g$ 离心10 min。取100-500 μL 上清, 加入到3KD超滤管, $12000 \times g$ 离心10 min, 取滤出液收集管中的滤出液待测。

细胞样本: 按每 1×10^6 个细胞, 加入0.3 mL试剂一匀浆, 4°C , $10000 \times g$ 离心10 min。取100-500 μL 上清液, 加入到3KD超滤管, $12000 \times g$ 离心10 min, 取滤出液收集管中的滤出液待测。

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: $1.7-471.7 \mu\text{mol/L}$, 请参考下表稀释(仅供参考):

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠肝组织	3-4	10%小鼠心组织	3-4
10%小鼠肝组织	3-4	狗血清	不稀释
10%大鼠肾组织	3-4	马血浆	不稀释
10%大鼠心组织	3-4	1.0×10^6 个 CHO 细胞	不稀释
1.0×10^6 个 Jurkat 细胞	不稀释	1.0×10^6 个 HL-60 细胞	不稀释
1.0×10^6 个 Molt-4 细胞	不稀释	1.0×10^6 个 THP-1 细胞	不稀释
1.0×10^6 个 293T 细胞	不稀释		

注: 稀释液为试剂一。

操作步骤

- ① 标准孔：取 20 μL 不同浓度的标准品溶液，加入相应的酶标板孔中。
测定孔/对照孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标板孔中。
- ② 向步骤①中标准孔和测定孔加入 200 μL 测定工作液，向对照孔加入 200 μL 对照工作液。
- ③ 向步骤②中各孔加入 40 μL 试剂六。
- ④ 振板 5 s, 37°C 避光孵育 40 min, 酶标仪 450 nm 波长下检测各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	20	--	--
待测样本(μL)	--	20	20
测定工作液(μL)	200	200	--
对照工作液(μL)	--	--	200
试剂六(μL)	40	40	40
振板 5 s, 37°C 避光孵育 40 min 后酶标仪 450 nm 波长下检测各孔 OD 值。			

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

血清（浆）中天冬氨酸含量计算公式：

$$\begin{aligned} \text{天冬氨酸含量} \\ (\mu\text{mol/L}) \end{aligned} = (\Delta A_{450} - b) \div a \times f$$

组织样本中天冬氨酸含量计算公式：

$$\begin{aligned} \text{天冬氨酸含量} \\ (\mu\text{mol/kg wet weight}) \end{aligned} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div \frac{m}{V} \times f$$

细胞样本中天冬氨酸含量计算公式：

$$\begin{aligned} \text{天冬氨酸含量} \\ (\mu\text{mol}/10^6) \end{aligned} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div \frac{n}{V} \times f$$

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} : 样本的变化 OD 值 ($\Delta A_{450} = OD_{\text{测定}} - OD_{\text{对照}}$)

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

m: 组织湿重质量, g

n: 细胞样本数量, 10^6

V: 样本匀浆液体积, mL

附录1 关键数据

1. 技术参数

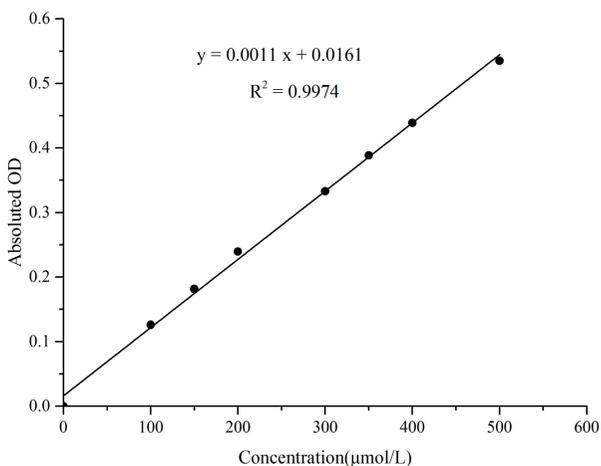
检测范围	1.7-471.7 $\mu\text{mol/L}$	批间差	4.4-9.0 %
灵敏度	1.7 $\mu\text{mol/L}$	批内差	1.9-4.3 %
加标回收率	96-101 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL , 按照操作步骤进行实验, OD值如下表所示:

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	100	150	200	300	350	400	500
OD 值	0.129	0.259	0.320	0.367	0.467	0.523	0.572	0.666
	0.137	0.259	0.309	0.378	0.465	0.520	0.572	0.670
平均 OD 值	0.133	0.259	0.315	0.373	0.466	0.522	0.572	0.668
绝对 OD 值	0	0.126	0.182	0.240	0.333	0.389	0.439	0.535

② 绘制标曲(如下图):



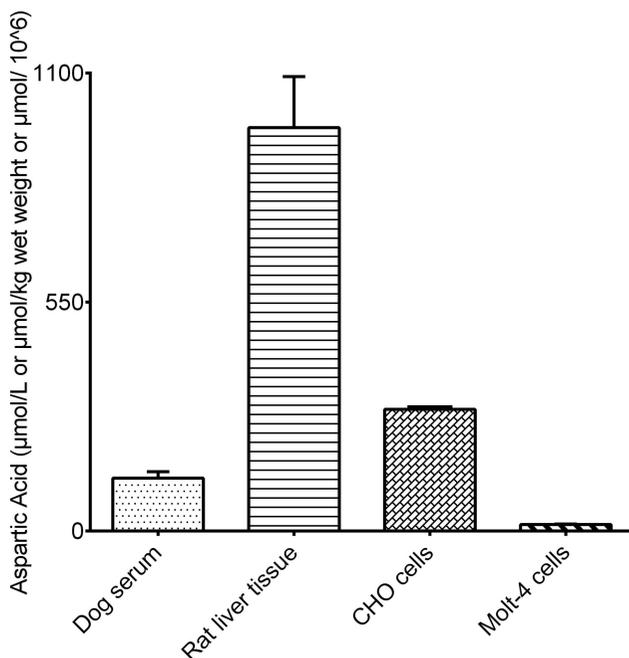
附录2 实例分析

例如小鼠肝组织(数据仅供参考):

取稀释3倍的10%大鼠肝组织匀浆20 μL , 加入到酶标板孔中, 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 0.0011x + 0.0161$, 样本测定OD值为0.510, 样本对照OD值为0.450, $\Delta A_{450} = \text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{测定}} = 0.510 - 0.450 = 0.052$, 计算结果为:

$$\text{天冬氨酸含量} \quad (\mu\text{mol/kg wet weight}) = (0.052 - 0.0161) \div 0.0011 \div \frac{0.1}{0.9} \times 3 = 881 \mu\text{mol/kg wet weight}$$

按说明书操作, 测定狗血清(加样量20 μL)、10%大鼠肝组织(稀释3倍, 加样量20 μL)、CHO细胞(加样量20 μL)、Molt-4细胞(加样量20 μL)中的天冬氨酸含量(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。

