（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-K901-M

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(402-422 nm)

Elabscience®草酰乙酸（OAA）比色法测试盒

Oxaloacetate（OAA）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动物组织样本中草酰乙酸的含量。

检测原理

草酰乙酸(OAA)是三羧酸循环中间体之一，也是生物体内碳氮代谢中的一个重要物质。草酰乙酸在酶的作用下与底物乙酰辅酶 A 发生发应，生成的物质可与 DTNB 发生显色反应，该产物在 412 nm 处有最大吸收峰，通过测定吸光度的值来测定草酰乙酸的含量。

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)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 (Substrate)	1 mL×1 支	2 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	酶液×1 支	酶液×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	1.2 mL×1 支	2.4 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	标准品 (Standard)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	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(402-422 nm，最佳检测波长 412 nm)，恒温箱(37°C)

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)

耗材：50 KD 超滤管

试剂准备

① 检测前，所有试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液配制：

将试剂一与试剂二按照9: 1体积比进行混合，充分混匀后避光待用，未使用完的工作液分装后-20°C避光保存，7天内使用完毕。

③ 试剂三工作液配制：

取一支试剂三加入1170 μL双蒸水混匀，充分混匀后置于冰盒上避光待用，配好的工作液两周内使用完毕。

④ 50 mmol/L标准品配制：

取一支试剂五，加入1 mL双蒸水溶解混匀，配制好的标准品溶液置于冰盒上避光保存，未使用完毕的工作液-20°C避光保存7天。

⑤ 1 mmol/L标准品配制：

将50 mmol/L标准品与双蒸水按照1: 49的体积比进行稀释，稀释后的溶液即为1 mmol/L标准品，现配现用。

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**	**0.1**	**0.2**	**0.3**	**0.5**	**0.6**	**0.8**	**1.0**
1 mmol/L 标准品(μL)	0	20	40	60	100	120	160	200
双蒸水(μL)	200	180	160	140	100	80	40	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：取0.1 g新鲜组织，加入0.9 mL生理盐水（0.9% NaCl）匀浆，4°C，12000 × g离心15 min，取上清用50 KD超滤管离心过滤，收集滤液待测。

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：0.017-1 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
10%大鼠肝组织	不稀释	10%大鼠脑组织	不稀释
10%大鼠肺组织	不稀释	10%小鼠肝组织	不稀释
10%小鼠肾组织	不稀释	10%小鼠腿部肌肉	不稀释
10%猪心组织	不稀释	人尿液	不稀释

注：稀释液为生理盐水（0.9%NaCl）。

实验关键点

① 所有需避光试剂要严格避光保存。

② 试剂四使用前需进行混匀，使用过程置于冰盒上避光保存。

③ 试剂一不可加热溶解，避免反复冻融。

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：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。

② 向步骤①中标准孔和测定孔各加入 140 μL 试剂二工作液。

③ 向步骤②的各孔中加入 20 μL 试剂三工作液。

④ 向步骤③的各孔中加入 20 μL 试剂四。

⑤ 振板 5 s，室温避光孵育 3 min，酶标仪于 412 nm 波长测定各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	**测定孔**
不同浓度标准品(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
试剂二工作液(μL)	140	140
试剂三工作液(μL)	20	20
试剂四(μL)	20	20
振板 5 s，室温避光孵育 3 min，酶标仪于 412 nm 波长测定各孔 OD 值。		

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

组织样本中草酰乙酸（OAA）含量计算公式：

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

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：标准曲线斜率

b：标准曲线截距

ΔA：样本的绝对 OD 值(测定孔 OD 值-空白孔 OD 值)

m：组织样本的质量, g

V：匀浆液体积, mL

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

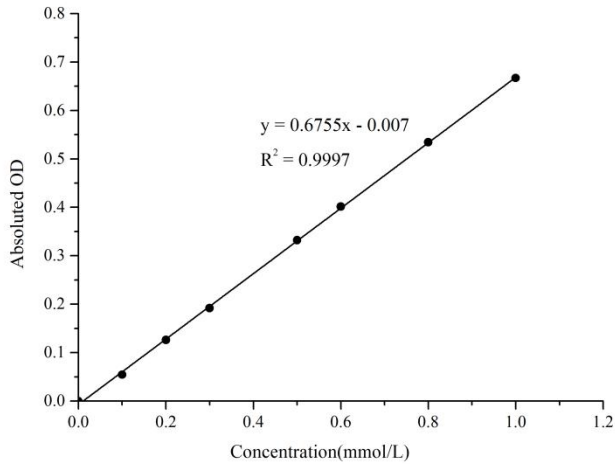
检测范围	0.017-1 mmol/L	平均批间差	2.3 %
灵敏度	0.017 mmol/L	平均批内差	2.1 %
平均回收率	101 %		

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 (mmol/L)	0.00	0.10	0.20	0.30	0.50	0.60	0.80	1.00
OD 值	0.287	0.338	0.410	0.474	0.613	0.684	0.823	0.952
	0.269	0.327	0.399	0.466	0.607	0.675	0.802	0.938
平均 OD 值	0.278	0.333	0.405	0.470	0.610	0.680	0.813	0.945
绝对 OD 值	0.000	0.055	0.127	0.192	0.332	0.402	0.535	0.667

② 绘制标曲(如下图)



附录2 实例分析

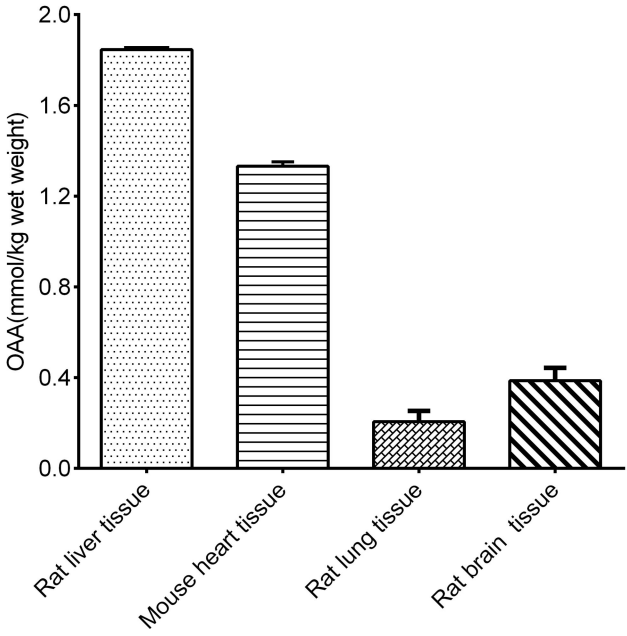
例如检测大鼠肝组织(数据仅供参考)：

取处理好的10%的大鼠肝组织样本20 μL，按说明书操作表操作，结果如下：标准曲线：y = 0.6755 x - 0.007，空白孔平均OD值为0.278，测定孔平均OD值为0.410，计算结果为：

$$\text{OAA 含量 (mmol/kg wet weight)} = ((0.410 - 0.278) + 0.007) \div 0.6755 \div (0.1 \div 0.9)$$

$$= 1.85 \text{ mmol/kg wet weight}$$

按照说明书，测定10%大鼠肝组织匀浆(加样量20 μL)、10%小鼠心组织匀浆(加样量20 μL)、10%大鼠肺组织匀浆(加样量20 μL)及10%大鼠脑组织匀浆(加样量20 μL)的草酰乙酸含量如下图所示：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
空白值较大（大于 0.5）	试剂四工作液没有避光保存	严格低温避光保存

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。