（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-K902-M

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：酶标仪(550 - 560 nm)

Elabscience®琥珀酸比色法测试盒

Succinic Acid 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琥珀酸的含量。

检测原理

琥珀酸(Succinic acid)又叫丁二酸，广泛存在于所有动植物组织中，最早从琥珀中提取，是柠檬酸循环的中间体，在细胞内能量产生中起重要作用。琥珀酸或琥珀酸盐(Succinate)由于其毒性低，被广泛应用于农业、食品和医药工业。

琥珀酸通过酶试剂催化下与显色剂生成有颜色的物质在波长 555 nm 处有最大吸收，通过测定 555 nm 处的 OD 值大小和标准曲线可以计算样本中琥珀酸含量。

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 A (Buffer Solution A)	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 B (Buffer Solution B)	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	促进剂 (Accelerant)	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	酶试剂 A (Enzyme Reagent A)	0.5 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	酶试剂 B (Enzyme Reagent B)	1.5 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	显色剂 (Chromogenic Agent)	5 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂八 (Reagent 8)	4 mmol/L 标准品溶液 (4 mmol/L Standard Solution)	1 mL×1 支	-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(550-560 nm，最佳检测波长 555 nm)、37°C 恒温箱

耗材：10 KD 超滤管

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25℃。

② 试剂三工作液的配制：

取一支试剂三加入1 mL试剂一混匀溶解，置于冰上避光待用，未使用完的-20ºC避光保存，2天内使用有效。

③ 试剂四工作液的配制：

取一支试剂四加入1.5 mL试剂二混匀溶解，置于冰上避光待用，未使用完的-20ºC避光保存，2天内使用有效。

④ 试剂五工作液的配制：

将试剂一：试剂五按体积比=9：1配制，置于冰上避光待用，现配现用，1天内使用有效。

⑤ 测定工作液的配制：

将试剂一：试剂三工作液按体积比= 14：1配制，置于冰上避光待用，现配现用，1天内使用有效。

⑥ 显色工作液的配制：

将试剂二：试剂四工作液：试剂六：试剂七按体积比=26：2：2：6配制，在加入测定工作液至板孔后的孵育阶段进行配制，置于冰上避光待用。30 min内使用有效。

⑦ 0.5 mmol/L标准品的配制：

将双蒸水：试剂八按体积比=7：1配制，避光待用，现配现用，一天内使用有效。

⑧ 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**	**0.10**	**0.15**	**0.20**	**0.30**	**0.35**	**0.40**	**0.50**
0.5 mmol/L 标准品(μL)	0	40	60	80	120	140	160	200
双蒸水(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上清，加入到10 KD超滤管，12000 × g 离心15 min，取外管滤出液待测。

组织样本:按照组织样本质量(g)：双蒸水体积(mL)=1：9的比例匀浆，4ºC，10000 × g离心10 min。取100-500 μL上清，加入到10 KD超滤管，12000 × g 离心15 min，取外管滤出液待测。

细胞样本：取1×10^6个细胞，加入200 μL双蒸水匀浆处理细胞。4ºC，10000 × g离心10 min。取上清，加入到10 KD超滤管，12000 × g 离心15 min，取外管滤出液待测。

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：0.007-0.5 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%小鼠肝组织	不稀释	人血清	不稀释
10%小鼠肾组织	不稀释	1×10^6 个 Molt-4 细胞	不稀释
10%大鼠肝组织	不稀释	1×10^6 个 HL-60 细胞	不稀释
10%大鼠心组织	不稀释	1×10^6 个 Jurkat 细胞	不稀释
10%大鼠肺组织	不稀释	1×10^6 个 Hela 细胞	不稀释

注：稀释液为双蒸水。

操作步骤

① 标准孔：取 20 μL 不同浓度标准品溶液，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；
对照孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。

② 向步骤①中标准孔和测定孔加入 30 μL 试剂五工作液；
向步骤①中对照孔加入 30 μL 试剂一。

③ 向步骤②中各孔加入 80 μL 测定工作液。

④ 振板 5 s，37°C 避光孵育 5 min。

⑤ 向④中各孔加入 120 μL 显色工作液。

⑥ 振板 5 s，37°C 避光孵育 20 min，酶标仪 555 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
试剂五工作液(μL)	30	30	--
试剂一(μL)	--	--	30
测定工作液(μL)	80	80	80
振板 5 s，37°C 避光孵育 5 min			
显色工作液(μL)	120	120	120
振板 5 s，37°C 避光孵育 20 min，酶标仪 555 nm 波长下检测各孔 OD 值。			

结果计算

标准品拟合曲线：y = ax + b

① 血清（浆）中琥珀酸含量计算公式：

$$\text{琥珀酸含量 (mmol/L)} = (\Delta A_{555} - b) \div a \times f$$

② 组织样本中琥珀酸含量计算公式：

$$\text{琥珀酸含量 (mmol/Kg wet weight)} = (\Delta A_{555} - b) \div a \div \frac{m}{V} \times f$$

③ 细胞样本中琥珀酸含量计算公式：

$$\text{琥珀酸含量 (μmol/10^6)} = (\Delta A_{555} - b) \div a \div \frac{n}{V} \times f$$

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_{555}：$A_{测定} - A_{对照}$

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

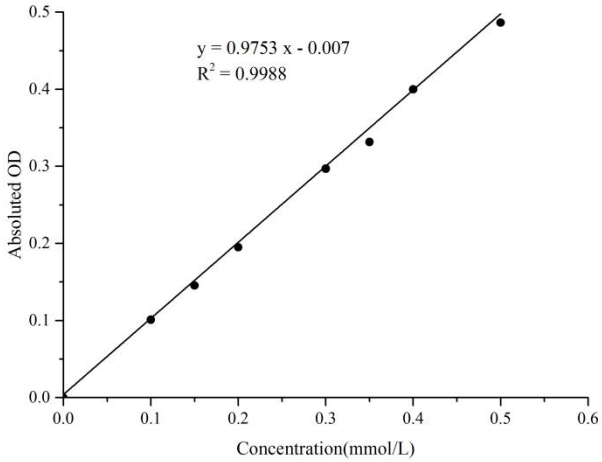
检测范围	0.007-0.5 mmol/L	**批间差**	3.4-9.3%
灵敏度	0.007 mmol/L	**批内差**	3.0-6.0%
加标回收率	90-95%		

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**	**0.10**	**0.15**	**0.20**	**0.30**	**0.35**	**0.40**	**0.50**
OD 值	0.405	0.496	0.548	0.598	0.684	0.733	0.797	0.884
	0.390	0.501	0.538	0.587	0.705	0.725	0.798	0.884
平均 OD 值	0.398	0.499	0.543	0.593	0.695	0.729	0.798	0.884
绝对 OD 值	0.000	0.101	0.146	0.195	0.297	0.332	0.400	0.487

② 绘制标曲(如下图)：



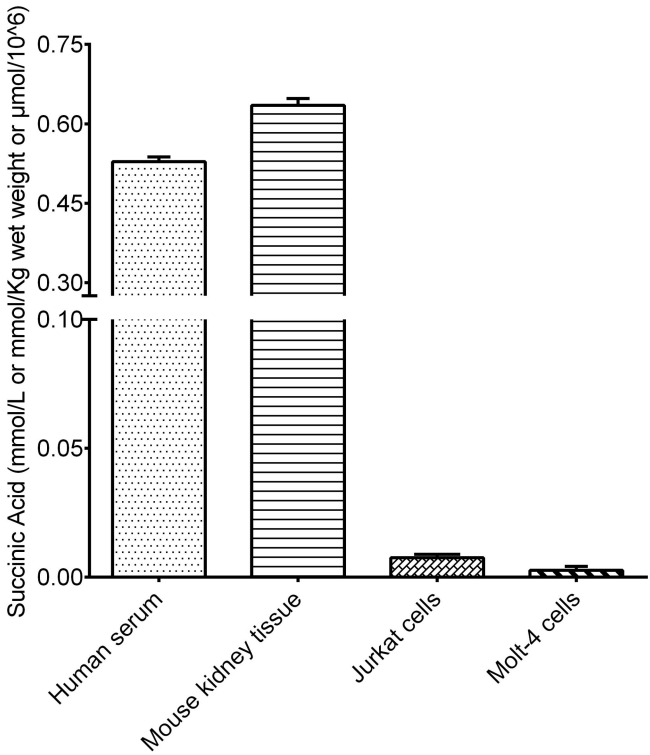
附录2 实例分析

例如小鼠肾组织(数据仅供参考):

取20 μL 10%小鼠肾组织匀浆滤出液加入到酶标板孔中，按操作表操作，结果如下：测定孔OD值为0.622，对照OD值为0.574，$\Delta A_{555} = A_{测定} - A_{对照}$ $= 0.622 - 0.574 = 0.048$，标准曲线：$y = 0.9753\,x - 0.007$，计算结果为：

$$\underset{\text{(mmol/Kg wet weight)}}{\text{琥珀酸含量}} = (0.048 + 0.007) \div 0.9753 \div \frac{0.1}{0.9} \times 1 = 0.627 \text{ mmol/Kg wet weight}$$

按说明书操作，人血清(加样量20 μL)、10%小鼠肾组织(加样量20 μL)、Jurkat细胞(1.12×10^6个，加样量20 μL)、Molt-4细胞(2.13×10^6个，加样量20 μL)中的琥珀酸含量(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
标准品不成线性，$R^2<0.99$	试剂三工作液因长时间放置，导致试剂部分降解	重新配制新的试剂三工作液

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。