

## 支链氨基酸检测试剂盒(WST-8法)

| 产品编号   | 产品名称               | 包装   |
|--------|--------------------|------|
| S0535S | 支链氨基酸检测试剂盒(WST-8法) | 100次 |

### 产品简介:

- 碧云天研发的支链氨基酸检测试剂盒(WST-8法) (Branched Chain Amino Acid Assay Kit with WST-8 or BCAA Assay Kit with WST-8), 是一种基于WST-8显色反应, 通过比色法, 快速、高灵敏地对血清、血浆和尿液等生物体液、组织和细胞裂解液以及细胞培养上清样品中支链氨基酸的含量进行检测的试剂盒。
- 支链氨基酸(Branched-chain amino acid, BCAA)是蛋白质中常见的、侧链具有分支的亮氨酸、缬氨酸和异亮氨酸这三种氨基酸的统称。支链氨基酸包含的这三种氨基酸都是人体的必需氨基酸, 其中亮氨酸是蛋白质中含量最丰富的氨基酸, 也是饮食中蛋白质代谢或组织中蛋白质分解的主要产物。支链氨基酸占肌肉蛋白质中必需氨基酸的35%, 占哺乳动物必需氨基酸的40%[1]。支链氨基酸不仅是蛋白质的合成原料, 还具有特殊的生物学功能, 也可作为生物体的能量来源, 在医药、食品及饲料等领域中也有广泛的用途[2]。
- 支链氨基酸具有多种代谢和生理作用。代谢方面, 支链氨基酸可以参与蛋白质的合成、信号转导和葡萄糖代谢等。生理学方面, 支链氨基酸在免疫系统和神经系统中发挥重要作用。支链氨基酸通过免疫细胞表达的脱氢酶和脱羧酶被有效分解, 并且是淋巴细胞生长、增殖和细胞毒性T淋巴细胞活动必需的物质。支链氨基酸与芳香族氨基酸共同进入大脑的相同转运蛋白, 在蛋白质合成、神经递质合成和能量代谢中发挥作用。作为人体必需氨基酸, 支链氨基酸不能在人体内合成, 但它们可被一些酶催化发生分解代谢。许多作用于这些支链氨基酸的酶可以利用这三种氨基酸作为底物, 从而调节这三种支链氨基酸的水平。支链氨基酸中有一种氨基酸水平发生变化, 则另外两个氨基酸通常也会出现相同方向性和量级水平的变化[3]。
- 本试剂盒的检测原理如图1所示。支链氨基酸在支链氨基酸脱氢酶(Leucine Dehydrogenase, Isoleucine Dehydrogenase and Valine Dehydrogenase, Leu/Ile/Val Dehydrogenase)的作用下氧化生成 $\alpha$ -酮异己酸( $\alpha$ -Ketoisocaproate, KIC), 在这一反应过程中 $NAD^+$ 被还原为NADH; 生成的NADH在电子耦合试剂1-mPMS (1-Methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate)的作用下将WST-8还原生成橙黄色的Formazan, 在450nm左右有最大吸收峰。反应体系中生成的Formazan与样品中支链氨基酸的含量成正比。

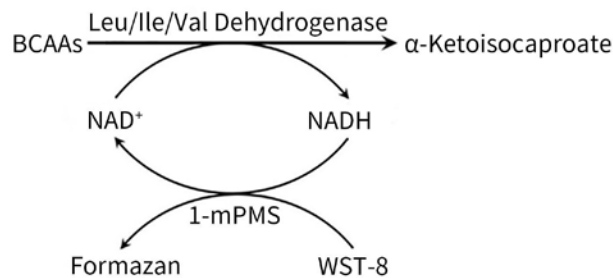


图1. 碧云天支链氨基酸检测试剂盒(WST-8法) (S0535)检测原理图。

- **本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽, 样品用量少。**本试剂盒在样品体积为20 $\mu$ l时可以检测浓度低至20 $\mu$ M的支链氨基酸, 在20 $\mu$ M-2000 $\mu$ M (0.4-40nmol)浓度范围内有良好的线性关系。本试剂盒提供了亮氨酸标准溶液, 可以通过设置标准曲线(图2), 从而计算出样品中的支链氨基酸含量。

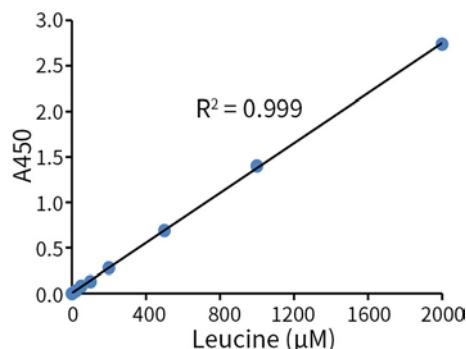


图2. 碧云天支链氨基酸检测试剂盒(WST-8法) (S0535)检测亮氨酸标准品的标准曲线。本试剂盒测定亮氨酸标准品, 在20-2000 $\mu$ M浓度范围内有良好的线性关系。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- **本试剂盒提供的检测裂解液有一定的通用性。**使用本试剂盒中的BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay裂解获得的细胞或组织样品，也可以用于碧云天生产的其它代谢类试剂盒中同样使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay进行裂解的样品检测，通用性强；，而且还可用于检测蛋白浓度、进行SDS-PAGE或一些较易溶解蛋白的Western检测。
- **本试剂盒使用灵活，检测速度快，适用范围广。**本试剂盒可用于小鼠、大鼠、人等的血清、血浆、尿液等生物体液，细胞培养上清、组织或细胞样品等的检测，全程约0.5-1小时即可完成。本试剂盒不仅适合少量样品的检测，也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统。
- 按照使用说明操作，用于96孔板检测时，本试剂盒小包装可以进行100次检测。

#### 包装清单：

| 产品编号     | 产品名称                                    | 包装    |
|----------|---|-------|
| S0535S-1 | BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay | 20ml  |
| S0535S-2 | 支链氨基酸检测缓冲液                              | 20ml  |
| S0535S-3 | 酶溶液                                     | 200μl |
| S0535S-4 | 显色液                                     | 200μl |
| S0535S-5 | 底物                                      | 200μl |
| S0535S-6 | 亮氨酸标准溶液(50mM)                           | 200μl |
| —        | 说明书                                     | 1份    |

#### 保存条件：

-20℃保存，一年有效。其中显色液和底物须避光保存。

#### 注意事项：

- BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay、支链氨基酸检测缓冲液(后续简称检测缓冲液)、显色液和底物需要完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。酶溶液和亮氨酸标准溶液使用时应在冰上进行。
- 底物从-20℃取出在融解过程中可能会有析出，平衡至室温后析出的部分会复溶，不会对检测结果产生影响。
- 血清等样品如在4℃保存，保存时间不得超过2周，否则会影响检测结果的准确性。通常血清样品宜-20℃保存，-80℃保存更佳。
- 为减少稀释液产生的背景带来的误差，样品和标准品的稀释液应该根据样品的种类来定。当样品为BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay制备的细胞或组织的裂解样品时，应使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay稀释，当样品为血液等其它样品时，宜使用检测缓冲液稀释。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

#### 使用说明：

##### 1. 样品的准备：

- 血液样品的准备：**对于血清样品，将全血在常温如25℃下放置30分钟至2小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4℃约1000-2000×g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀；对于血浆样品，将全血用肝素或者EDTA进行抗凝，4℃约1000-2000×g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。血清和血浆都需置于冰上，如果不能立即检测，也可以分装并短期保存于-20℃或-80℃。对于冻存的样品，在检测前解冻后冰浴存放备用，使用前必须混匀。
- 细胞或组织样品的准备：**对于培养的贴壁细胞，PBS (C0221A)洗涤一次并吸净残留液体。对于培养的悬浮细胞，先适当离心(如100-500×g, 5分钟)收集细胞到离心管内，弃上清并吸净残留液体。按照每100万细胞加入100-200μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例加入裂解液，适当吹打，冰浴5-10分钟以充分裂解细胞。4℃约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。对于组织样品，按照每10mg组织加入100μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例，使用TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48) (E6618)、TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600)或玻璃匀浆器在约4℃或冰浴等低温条件下进行匀浆。4℃约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。以上所有操作均需在4℃或冰上进行。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测，可以-20℃或-80℃冻存。
- 细胞培养上清样品的准备：**对于贴壁细胞，直接取培养液；对于悬浮细胞，离心取培养液。

##### 2. 试剂盒的准备：

- 融解BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay、检测缓冲液、显色液和底物，平衡至室温后混匀备用。其它试剂存放于冰浴备用，使用完后宜立即按照试剂盒要求的条件保存。
- 显色工作液(Working Solution)的配制：**按照每个检测反应80μl的体积配制适量的显色工作液。均匀混合74μl检测缓冲液(BCAA Assay Buffer)、2μl酶溶液(Enzyme Solution)、2μl显色液(Chromogen Solution)、2μl底物(Substrate)，即可配制成80μl显色工作液(Working Solution)。根据待检测样品(包括标准品)的数量，配制适量的显色工作液。具体配制方法参考下表。配制好的显色工作液如果置于4℃或冰浴避光保存，可以在当天使用，但建议尽量现配现用。

| Samples                | 1  | 10  | 20   | 50   |
|------------------------|----|-----|------|------|
| BCAA Assay Buffer (μl) | 74 | 740 | 1480 | 3700 |
| Enzyme Solution (μl)   | 2  | 20  | 40   | 100  |

|                              |           |            |             |             |
|------------------------------|-----------|------------|-------------|-------------|
| Chromogen Solution (μl)      | 2         | 20         | 40          | 100         |
| Substrate (μl)               | 2         | 20         | 40          | 100         |
| <b>Working Solution (μl)</b> | <b>80</b> | <b>800</b> | <b>1600</b> | <b>4000</b> |

注1: 由于酶溶液的用量较少且易沉降, 必须注意在使用前先轻轻离心一下, 然后适当混匀后再使用。

注2: NADH和NADPH的存在会对支链氨基酸的检测产生干扰。如果样品含有NADH和NADPH, 需同时设置样品的背景对照孔, 加入不含酶溶液的显色工作液, 即配制显色工作液时2μl酶溶液用检测缓冲液替代。计算时样品孔的数据需要减去背景对照孔的数据。

### 3. 样品测定:

a. 亮氨酸标准曲线的设置: 取8μl亮氨酸标准溶液(50mM), 加入192μl检测裂解液或检测缓冲液(如果检测BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay制备的细胞或组织裂解样品, 使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay; 如果是血液、上清等无需处理的样品, 可以使用检测缓冲液), 混匀, 即得浓度为2000μM的亮氨酸标准溶液。分别取2000μM的亮氨酸标准溶液0、1、2、5、10、20μl加入96孔板的标准品孔中, 并用对应的BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay或缓冲液补足到20μl, 此时标准曲线的浓度为0、100、200、500、1000、2000μM。

b. 取1-20μl稀释后的样品至96孔板样品孔中, 并相应地加入检测裂解液或检测缓冲液至样品孔中, 补足到20μl。同时设置仅含检测裂解液或检测缓冲液的孔为空白对照孔。

注: 为确保数值在标准曲线范围内, 建议进行预实验将样品同时设定多个稀释倍数, 以确定样品的大致浓度。如果数值不在标准曲线范围内, 可调整样品的稀释倍数或者增加样品的用量。如果检测BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay制备的细胞或组织裂解样品, 使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay稀释; 如果检测血液、上清等无需裂解处理的样品, 使用检测缓冲液稀释。此处的样品总稀释倍数记为n (例如本步骤中对样品进行了10倍稀释, 加入的‘稀释后的样品’为10μl, 则 $n=10 \times 20/10=20$ )。

c. 各孔加入显色工作液80μl, 混匀, 37°C反应30分钟。

注: 如果吸光度偏低, 可适当延长反应时间。

d. 在450nm测定吸光度。

e. 建立标准曲线, 并计算样品中支链氨基酸的浓度(记录为A), 如果样品背景对照孔吸光度比较高, 样品的吸光度需要减去样品背景对照孔的吸光度。支链氨基酸标准曲线可以参考图2, 在20μM-2000μM浓度范围内有良好的线性关系。支链氨基酸浓度C的计算公式如下:

$$C (\mu M) = A \times n$$

注: A为步骤3e根据标准曲线确定的稀释后的样品支链氨基酸浓度(μM);

n为步骤3b样品总稀释倍数。

### 参考文献:

1. Shimomura Y, Murakami T, Nakai N, Nagasaki M, Harris RA. J Nutr. 2004. 134(6 Suppl):1583S-1587S.
2. Tom A, Nair KS. J Nutr. 2006. 136(1 Suppl):324S-330S.
3. Yoneshiro T, Wang Q, Tajima K, Matsushita M, Maki H, et al. Nature. 2019. 572(7771):614-619.

### 相关产品:

| 产品编号        | 产品名称                     | 包装        |
|-------------|--------------------------|-----------|
| C0016/C0017 | 乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒           | 100次/500次 |
| C0018S/M    | 乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法)   | 100次/500次 |
| S0110S      | 黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒(WST-8法)    | 100次      |
| S0111S      | 黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒(WST-8法)   | 100次      |
| S0112S/M    | Amplex Red黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒  | 100次/500次 |
| S0113S      | Amplex Red黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒 | 100次      |
| S0114S      | 黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒(WST-8法)    | 100次      |
| S0204S      | D-乳酸检测试剂盒(WST-8法)        | 100次      |
| S0208S      | L-乳酸检测试剂盒(WST-8法)        | 100次      |
| S0211S/M    | Amplex Red胆固醇与胆固醇酯检测试剂盒  | 100次/500次 |
| S0215S/M    | Amplex Red游离脂肪酸检测试剂盒     | 100次/500次 |
| S0219S/M    | Amplex Red甘油三酯检测试剂盒      | 100次/500次 |
| S0223S/M    | Amplex Red甘油检测试剂盒        | 100次/500次 |
| S0227S      | Amplex Red L-乳酸检测试剂盒     | 100次      |
| S0231S      | Amplex Red尿酸与尿酸酶检测试剂盒    | 100次      |
| S0235S      | Amplex Red磷酸盐检测试剂盒       | 100次      |
| S0239S      | Amplex Red乙醇检测试剂盒        | 100次      |
| S0243S/M    | Amplex Red黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒  | 100次/500次 |

|        |                                |      |
|--------|--------------------------------|------|
| S0247S | Amplex Red谷氨酸与谷氨酸氧化酶检测试剂盒      | 100次 |
| S0251S | Amplex Red过氧化氢与过氧化物酶检测试剂盒      | 100次 |
| S0255S | Amplex Red过氧化氢酶检测试剂盒           | 100次 |
| S0259S | Amplex Red单胺氧化酶检测试剂盒           | 100次 |
| S0263S | Amplex Red鞘磷脂酶检测试剂盒            | 100次 |
| S0267S | Amplex Red胆碱与乙酰胆碱检测试剂盒         | 100次 |
| S0271S | Amplex Red乙酰胆碱酯酶检测试剂盒          | 100次 |
| S0275S | Amplex Red磷脂酰胆碱检测试剂盒           | 100次 |
| S0279S | Amplex Red磷脂酶D检测试剂盒            | 100次 |
| S0283S | Amplex Red肌酸检测试剂盒              | 100次 |
| S0287S | Amplex Red肌酸激酶检测试剂盒            | 100次 |
| S0291S | Amplex Red肌酐检测试剂盒              | 100次 |
| S0295S | Amplex Red肌氨酸检测试剂盒             | 100次 |
| S0299S | Amplex Red丙酮酸检测试剂盒             | 100次 |
| S0303S | Amplex Red丙酮酸激酶检测试剂盒           | 100次 |
| S0307S | Amplex Red ADP检测试剂盒            | 100次 |
| S0311S | Amplex Red磷酸烯醇式丙酮酸检测试剂盒        | 100次 |
| S0315S | Amplex Red丙氨酸检测试剂盒             | 100次 |
| S0319S | Amplex Red丙氨酸转氨酶检测试剂盒          | 100次 |
| S0323S | Amplex Red $\alpha$ -酮戊二酸检测试剂盒 | 100次 |
| S0327S | Amplex Red天冬氨酸检测试剂盒            | 100次 |
| S0331S | Amplex Red天冬氨酸氨基转移酶检测试剂盒       | 100次 |
| S0335S | Amplex Red柠檬酸检测试剂盒             | 100次 |
| S0339S | Amplex Red草酰乙酸检测试剂盒            | 100次 |
| S0343S | Amplex Red葡萄糖检测试剂盒             | 100次 |
| S0347S | Amplex Red葡萄糖氧化酶检测试剂盒          | 100次 |
| S0351S | Amplex Red果糖检测试剂盒              | 100次 |
| S0355S | Amplex Red乳糖检测试剂盒              | 100次 |
| S0359S | Amplex Red半乳糖与乳糖检测试剂盒          | 100次 |
| S0363S | Amplex Red半乳糖与半乳糖氧化酶检测试剂盒      | 100次 |
| S0367S | Amplex Red麦芽糖检测试剂盒             | 100次 |
| S0371S | Amplex Red麦芽糖与葡萄糖检测试剂盒         | 100次 |
| S0375S | Amplex Red糖原检测试剂盒              | 100次 |
| S0379S | Amplex Red磷酸果糖激酶检测试剂盒          | 100次 |
| S0383S | Amplex Red乙酰辅酶A检测试剂盒           | 100次 |
| S0387S | Amplex Red辅酶A检测试剂盒             | 100次 |
| S0391S | Amplex Red乙酰辅酶A合成酶检测试剂盒        | 100次 |
| S0511S | L-苹果酸检测试剂盒(WST-8法)             | 100次 |
| S0514S | 苹果酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)          | 100次 |
| S0517S | 延胡索酸检测试剂盒(WST-8法)              | 100次 |
| S0520S | 延胡索酸酶活性检测试剂盒(WST-8法)           | 100次 |
| S0523S | 异柠檬酸检测试剂盒(WST-8法)              | 100次 |
| S0526S | 异柠檬酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)         | 100次 |
| S0529S | Amplex Red琥珀酸检测试剂盒             | 100次 |
| S0530S | 琥珀酸脱氢酶活性检测试剂盒(显色法)             | 100次 |
| S0532S | Amplex Red琥珀酰辅酶A合成酶检测试剂盒       | 100次 |
| S0535S | 支链氨基酸检测试剂盒(WST-8法)             | 100次 |
| S0538S | N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法)        | 100次 |
| S0540S | 酪氨酸检测试剂盒(显色法)                  | 100次 |
| S0542S | 酪氨酸酶活性检测试剂盒(显色法)               | 100次 |
| S0545S | 酪氨酸酶抑制剂筛选试剂盒(显色法)              | 100次 |
| S0547S | 髓过氧化物酶活性检测试剂盒(显色法)             | 100次 |

|        |                          |      |
|--------|--------------------------|------|
| S0548S | Amplex Red髓过氧化物酶活性检测试剂盒  | 100次 |
| S0550S | Amplex Red髓过氧化物酶抑制剂筛选试剂盒 | 100次 |

Version 2024.07.12