

黄嘌呤/次黄嘌呤含量荧光法检测试剂盒

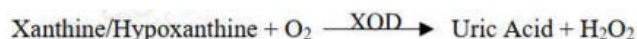
产品货号: BA3469

产品规格: 50T/24S; 100T/48S

产品说明:

黄嘌呤是和次黄嘌呤广泛存在于动物组织和植物细胞中,是嘌呤核苷酸代谢重要的中间产物,当体内缺乏黄嘌呤氧化酶(XOD)时,会导致黄嘌呤和次黄嘌呤在机体内积累,引发肾功能障碍。

黄嘌呤/次黄嘌呤在XOD的作用下氧化生成尿酸和 H_2O_2 , H_2O_2 在酶的作用下与荧光探针反应,生成强荧光产物,其在激发波长535nm、发射波长587nm处的荧光强度与 H_2O_2 含量成正比。本试剂盒通过测定 H_2O_2 的生成量,来计算样本黄嘌呤/次黄嘌呤含量。



注意:实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果荧光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

技术指标:

最低检出限: 0.078nmol/mL

线性范围: 0.156-5nmol/mL

试剂盒的组成和配制:

试剂名称	50T	100T	保存条件
提取液一	液体60mL×1瓶	液体110mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体10mL×1瓶	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体60mL×1瓶	液体120mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体0.015mL×1支	液体0.015mL×1支	2-8℃
试剂三	粉剂×1支	粉剂×2支	-20℃
试剂四	液体0.08mL×1支	液体0.12mL×1支	2-8℃
标准品	液体0.6mL×1支	液体0.6mL×1支	2-8℃

溶液的配制:

1. 试剂二: 临用前先使用掌上离心机离心至管底再吹打混匀。
2. 试剂二工作液: 临用前根据样本量将试剂一: 试剂二按 19μL:1μL(20μL, 20T)的比例配制试剂二工作液, 现用现配。
3. 试剂三: 临用前取一支加入 0.075mL DMSO。溶解后根据样本量分装, 当天使用的常温避光保存, 其余的-20℃ 避光保存, 可保存 12 周, 避免反复冻融。(该试剂为冻干试剂, 可能存在肉眼观察试剂量相差较大甚至量很少的现象, 此现象不影响使用, 实际质量相同)
4. 测定工作液: 临用前根据样本量将试剂一: 试剂二工作液: 试剂三: 试剂四按 470μL:10μL:10μL:10μL(500μL, 10T)的比例配制测定工作液, 现用现配, 避光保存。
5. 对照工作液: 临用前根据样本量将试剂一: 试剂三: 试剂四按 480μL:10μL:10μL(500μL, 10T)的比例配制对照工作液, 现用现配, 避光保存。
6. 标准品: 100μmol/mL 黄嘌呤标准品。临用前取 0.01mL 100μmol/mL 黄嘌呤标准品, 加入 0.99mL 试剂一, 充分混匀, 得到 1μmol/mL 黄嘌呤标准品, 现用现配。

注: 试剂二、试剂三、试剂四和标准品体积较小, 用前使用掌上离心机将液体甩离至底部。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

需自备的仪器和用品:

荧光酶标仪、天平、低温台式离心机、恒温培养箱/金属浴、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、可调式移液枪、96 孔黑色酶标板、EP 管、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理(可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1. 组织: ①按照组织质量(g): 试剂一体积(mL)为 1:5~10 的比例(建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一)进行冰浴匀浆, 10000g, 4℃ 离心 10min, 取上清(若按蛋白浓度计算, 需在此步骤留样测定); ②取 0.1mL 上清加入 1mL 提取液一, 4℃ 12000g 离心 10min, 取 0.8mL 上清液, 再缓慢加入 0.15mL 提取液二, 缓慢吹打混匀至无气泡产生, 10000g, 4℃ 离心 10min 后取上清置冰上待测。
2. 血清(浆)等液体样本: (若按蛋白浓度计算, 需在此步骤留样测定)。取 0.1mL 样本加入 1mL 提取液一, 4℃ 12000g 离心 10min, 取 0.8mL 上清液, 再缓慢加入 0.15mL 提取液二, 缓慢吹打混匀至无气泡产生, 10000g, 4℃ 离心 10min 后取上清置冰上待测。
3. 细菌/细胞: ①按照细胞数量(10^6 个):试剂一体积(mL)为 10~20:1 的比例(建议 1000 万细菌/细胞加入 0.5mL 试剂一), 冰浴超声波破碎细菌/细胞(功率 200w, 超声 3 秒, 间隔 6 秒, 总时间 3min); 然后 10000g, 4℃ 离心 10min, 取上清(若按蛋白浓度计算, 需在此步骤留样测定); ②取 0.4mL 上清加入 0.4mL 提取液一, 4℃ 12000g 离心 10min, 取 0.6mL 上清液, 再缓慢加入 0.056mL 提取液二, 缓慢吹打混匀至无气泡产生, 10000g, 4℃ 离心 10min 后取上清置冰上待测。

二、测定步骤

1. 荧光酶标仪预热 30min 以上, 调节至激发波长 535nm, 发射波长 587nm。
2. 临用前将测定工作液和对照工作液平衡至常温。
3. 标准品的稀释: 将 1 μ mol/mL(1000nmol/mL)黄嘌呤标准品用试剂一进行稀释得到 5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625nmol/mL 的标准品备用。
4. 标准品稀释可参考下表:

序号	稀释前浓度 (nmol/mL)	标准品体积 (μ L)	试剂一体积 (μ L)	稀释后浓度 (nmol/mL)
1	1000	10	990	10
2	10	200	200	5
3	5	200	200	2.5
4	2.5	200	200	1.25
5	1.25	200	200	0.625
6	0.625	200	200	0.3125
7	0.3125	200	200	0.15625

备注: 下述实验中每个标准管需 50 μ L 标准品 (注意不要在此步骤直接检测荧光值)。

5. 在 96 孔黑色酶标板按下表步骤加样:

试剂名称 (μ L)	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	50	50	-	-
标准品	-	-	50	-
蒸馏水	-	-	-	50
测定工作液	50	-	50	50
对照工作液	-	50	-	-
充分混匀, 37℃ 避光孵育 20min, 反应完成后于 Ex/Em=535nm/587nm 处测定荧光值				



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

RFU, 分别记为 RFU_{测定}、RFU_{对照}、RFU_{标准}和 RFU_{空白}, $\Delta\text{RFU}_{\text{测定}} = \text{RFU}_{\text{测定}} - \text{RFU}_{\text{对照}}$, $\Delta\text{RFU}_{\text{标准}} = \text{RFU}_{\text{标准}} - \text{RFU}_{\text{空白}}$ 。每个测定管需设置一个对照管。空白管和标准曲线只需测 1-2 次。

三、黄嘌呤/次黄嘌呤含量计算

1. 标准曲线的绘制:

根据标准管的浓度(x, nmol/mL)和荧光值 $\Delta\text{RFU}_{\text{标准}}$ (y, $\Delta\text{RFU}_{\text{标准}}$), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将 $\Delta\text{RFU}_{\text{测定}}$ (y, $\Delta\text{RFU}_{\text{测定}}$)带入公式计算样本浓度(x, nmol/mL)。

2. 黄嘌呤/次黄嘌呤含量的计算:

(1) 组织内含量计算

A.按样本质量计算:

黄嘌呤/次黄嘌呤含量(nmol/g 质量) = $x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{提取液一}} + V_{\text{液体}})] \times V_{\text{试剂一}} \div W \times F = 13.06 \times x \div W \times F$

B.按蛋白浓度计算:

黄嘌呤/次黄嘌呤含量(nmol/mg prot)

$= x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{提取液一}} + V_{\text{液体}})] \times V_{\text{试剂一}} \div (Cpr \times V_{\text{试剂一}}) \times F = 13.06 \times x \div Cpr \times F$

$V_{\text{上清}}$: 加提取液一后取上清的体积, 0.8mL; $V_{\text{提取液二}}$: 加入的提取液二体积, 0.15mL; $V_{\text{提取液一}}$: 加入的提取液一体积, 1mL; $V_{\text{液体}}$: 加入提取液一的液体样本体积, 0.1mL; $V_{\text{试剂一}}$: 加入样本的试剂一的体积, 1mL; W: 样本质量, g; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; F: 样本稀释倍数。

(2) 血清(浆)等液体内含量计算

A.按样本质量计算:

黄嘌呤/次黄嘌呤含量(nmol/mL) = $x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{提取液一}} + V_{\text{液体}})] \times F = 13.06 \times x \times F$

B.按蛋白浓度计算:

黄嘌呤/次黄嘌呤含量(nmol/mg prot) = $x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{提取液一}} + V_{\text{液体}})] \times Cpr \times F = 13.06 \times x \div Cpr \times F$

$V_{\text{上清}}$: 加提取液一后取上清的体积, 0.8mL; $V_{\text{提取液二}}$: 加入的提取液二体积, 0.15mL; $V_{\text{提取液一}}$: 加入的提取液一体积, 1mL; $V_{\text{液体}}$: 加入提取液一的液体样本体积, 0.1mL; $V_{\text{试剂一}}$: 加入样本的试剂一的体积, 1mL; W: 样本质量, g; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; F: 样本稀释倍数。

(3) 细胞/细菌内含量计算:

A.按细菌/细胞数量计算:

黄嘌呤/次黄嘌呤含量(nmol/ 10^6 cell) = $x \times (V'_{\text{上清}} + V'_{\text{提取液二}}) \div [V'_{\text{液体}} \times V'_{\text{上清}} \div (V'_{\text{提取液一}} + V'_{\text{液体}})] \times V'_{\text{试剂一}} \div N \times F$
 $= 1.09 \times x \div N \times F$

B.按蛋白浓度计算:

黄嘌呤/次黄嘌呤含量(nmol/mg prot)

$= x \times (V'_{\text{上清}} + V'_{\text{提取液二}}) \div [V'_{\text{液体}} \times V'_{\text{上清}} \div (V'_{\text{提取液一}} + V'_{\text{液体}})] \times V'_{\text{试剂一}} \div (Cpr \times V_{\text{试剂一}}) \times F = 1.09 \times x \div Cpr \times F$

$V'_{\text{上清}}$: 细胞提取中加提取液一后取上清的体积, 0.6mL; $V'_{\text{提取液二}}$: 细胞提取中加入的提取液二体积, 0.056mL; $V'_{\text{提取液一}}$: 细胞提取中加入的提取液一体积, 0.4mL; $V'_{\text{液体}}$: 细胞提取中加入提取液一的液体样本体积, 0.4mL; $V'_{\text{试剂一}}$: 细胞提取中加入样本的试剂一的体积, 0.5mL; N: 细胞/细菌总数, 以 10^6 计; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; F: 样本稀释倍数。

注意事项:

1. 配制好的工作液应为无色透明, 避光保存, 若工作液为浅粉色即不可用。
2. 如果测定值超过标准曲线最大值, 可以用蒸馏水稀释样本后再进行测定; 如果测定值低于标准曲线最小值, 可以增加操作表中的样本加入量或者增大样本处理时的样本加入比例; 注意同步修改计算公式。
3. 不同酶标仪检测得到的荧光值 RFU 可能存在差异, 属于正常现象。确定试剂配制和实验操作无误, 标准曲线线性良好, 检测结果就是准确有效的。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

实验实例：

1. 取 100 μ mol/mL 黄嘌呤标准品，稀释至 5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625nmol/mL，检测各标准管荧光值，建立得到标准曲线 $y=4,025,311.50x-81,810.35$ ， $R^2=0.9999$ 。
2. 不同类型样本检测结果如下：

样本	质量/体积/数量	稀释倍数	含量	单位
鸡肾脏	0.1g	1	98.98	nmol/g 质量
大鼠肝脏	0.1g	1	83.58	nmol/g 质量
Raji 细胞	10 $\times$ 10 ⁶ 个	1	0.066	nmol/10 ⁶ cell
牛血清	0.1mL	10	106.67	nmol/mL



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com