

(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-F091

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 587 nm)

Elabscience®色氨酸(Trp)荧光法测试盒

Tryptophan (Trp) Fluorometric 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)、组织及细胞样本中的色氨酸(Trp)的含量。

检测原理

色氨酸 (Tryptophan, Trp) 是一种参与多种生物合成过程的必需氨基酸, 它不仅参与多种蛋白质的合成, 还是许多具有生物活性物质的前体。Trp 被酶催化进行一系列反应生成过氧化氢, 过氧化氢与荧光探针形成红色络合物, 测定样品在激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm 处的荧光值, 即可计算样品中 Trp 的含量。

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 (Buffer)	28 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 A (Substrate A)	粉剂×3 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 B (Substrate B)	粉剂×3 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	探针 (Probe)	1.2 mL×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	2 mmol/L 标准品溶液 (2 mmol/L Standard Solution)	1 mL×2 支	-20℃ 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	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：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 587 nm)、37℃ 恒温箱

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)

耗材：3 KD 超滤管

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液的配制：

取一支试剂二用2.7 mL试剂一溶解混匀，未使用完的溶液2-8℃避光可保存一周。

③ 试剂三工作液的配制：

取一支试剂三用4 mL试剂一溶解混匀，未使用完的溶液2-8℃避光可保存一周。

④ 200 μmol/L标准品溶液的配制：

取100 μL试剂五用900 μL双蒸水溶解混匀，未使用完的溶液2-8℃可保存一周。

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(μmol/L)	0	40	80	100	120	140	160	200
200 μmol/L 标准品(μL)	0	40	80	100	120	140	160	200
双蒸水(μL)	200	160	120	100	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

血清（浆）样本：使用3 KD超滤管在4℃，12000 ×g离心15 min，收集滤液，置于冰上待测。

组织样本：按照组织样本质量(g): 生理盐水(0.9% NaCl)体积(mL) =1: 9的比例匀浆，4℃，10000 ×g离心10 min，取上清液，使用3 KD超滤管在4℃，12000 ×g离心15 min，收集滤液，置于冰上待测。

细胞样本：取 1×10^6 个细胞，加入200 μ L生理盐水(0.9% NaCl)匀浆，4℃，10000 ×g离心10 min，取上清液，使用3 KD超滤管在4℃，12000 ×g离心15 min，收集滤液，置于冰上待测。

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：0.33-200.00 μ 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
兔血清	不稀释	大鼠血清	不稀释
小鼠血浆	不稀释	胎牛血清	不稀释
人血清	3-8	大鼠血浆	不稀释
10%小鼠肝脏组织	不稀释	10%大鼠肝脏组织	不稀释
10%大鼠心脏组织	不稀释	10%小鼠肺组织	不稀释
0.193×10^6 个 HeLa 细胞	不稀释	0.7×10^6 个 Jurkat 细胞	不稀释
0.446×10^6 个 RAW 细胞	不稀释	0.708×10^6 个 Molt 细胞	不稀释

注：稀释液为生理盐水(0.9% NaCl)。

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、测定孔和对照孔加入 20 μL 试剂四。
- ③ 向②中标准孔和测定孔加入 100 μL 试剂二工作液。
- ④ 向②中对照孔加入 100 μL 试剂一。
- ⑤ 向③和④各孔加入 100 μL 试剂三工作液。
- ⑥ 振板 5 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 使用荧光酶标仪于激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm 处检测各孔荧光值。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度标准品溶液(μL)	20	--	--
待测样本(μL)	--	20	20
试剂四(μL)	20	20	20
试剂二工作液(μL)	100	100	--
试剂一(μL)	--	--	100
试剂三工作液	100	100	100
振板 5 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 使用荧光酶标仪于激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm 处检测各孔荧光值。			

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

血清(浆)样本中色氨酸(Trp)含量计算公式:

$$\text{Trp 含量} = \frac{\Delta F - b}{a} \times f$$

($\mu\text{mol/L}$)

组织样本中色氨酸(Trp)含量计算公式:

$$\text{Trp 含量} = \frac{\Delta F - b}{a} \div \frac{m}{V} \times f$$

($\mu\text{mol/kg wet weight}$)

细胞样本中色氨酸(Trp)含量计算公式:

$$\text{Trp 含量} = \frac{\Delta F - b}{a} \div \frac{n}{V} \times f$$

($\text{nmol}/10^6$)

注解:

y: 标准品荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔF : 样本的绝对荧光值(测定孔荧光值-对照孔荧光值)

V: 匀浆液体积, mL

m: 样本质量, g

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

n: 细胞样本数量, 10^6 个

附录1 关键数据

1. 技术参数

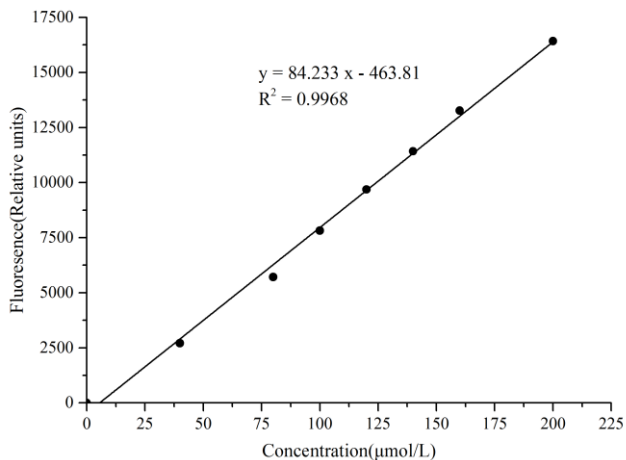
检测范围	0.33-200.00 $\mu\text{mol/L}$	批间差	2.5-5.6%
灵敏度	0.33 $\mu\text{mol/L}$	批内差	3.4-4.7%
加标回收率	87-99%		

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，荧光值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	40	80	100	120	140	160	200
荧光值	1914	4652	7441	9680	11456	13341	15252	18445
	1900	4585	7804	9781	11728	13316	15136	18211
平均荧光值	1907	4619	7622	9730	11592	13328	15174	18328
绝对荧光值	0	2712	5715	7823	9685	11421	13267	16421

②绘制标曲(如下图)：



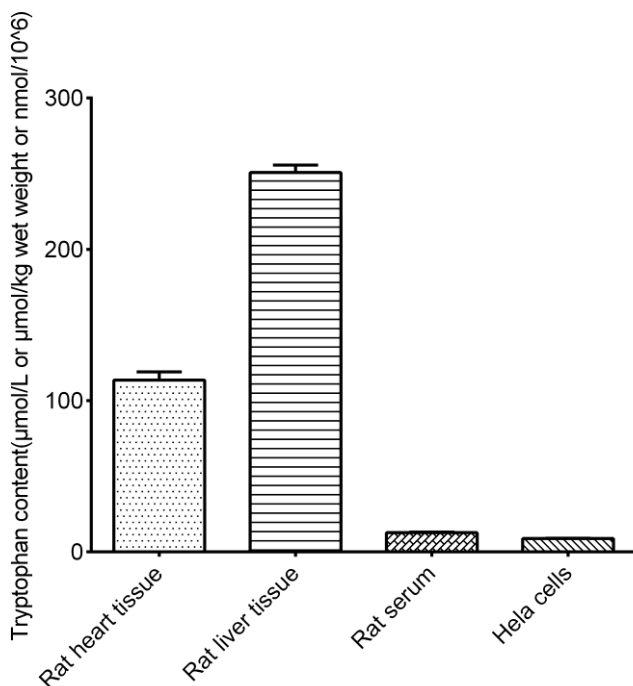
附录2 实例分析

例如检测大鼠肝组织(数据仅供参考):

取20 μL 10% 大鼠肝组织上清液, 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 84.233x - 463.81$, 测定孔平均荧光值为4828, 对照孔平均荧光值为2951, 计算结果为:

$$\begin{aligned}\text{Trp含量}(\mu\text{mol/kg wet weight}) &= (4828 - 2951 + 463.81) \div 84.233 \times 0.9 \div 0.1 \\ &= 250.11 \mu\text{mol/kg wet weight}\end{aligned}$$

按说明书操作, 测定大鼠心脏组织(加样量20 μL)、大鼠肝组织(加样量20 μL)、大鼠血清(加样量20 μL)、 1×10^6 个Hela细胞(加样量20 μL)中的Trp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。

