

(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-F151

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®磷酸二羟丙酮（DHAP）荧光法测试盒
Dihydroxyacetone Phosphate (DHAP) 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)及动物组织样本中的磷酸二羟丙酮 (DHAP) 的含量。

检测原理

磷酸二羟丙酮 (Dihydroxyacetone Phosphate, DHAP) 是一种存在于生物中的糖酵解和糖异生过程的中间产物。大多数动物由于没有乙醛酸循环, 不能像植物一样把脂肪酸异生成葡萄糖, 只能把脂肪中的甘油通过 DHAP 异生成葡萄糖或进入糖酵解途径。

检测原理: DHAP 经过一系列酶促反应转化的产物, 可以使得荧光探针产生荧光, 在最大激发波长 535 nm, 最大发射波长 587 nm 下使用荧光酶标仪检测荧光值来计算 DHAP 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 Solution)	20 mL×1 瓶	-20℃ 避光保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	0.12 mL×1 支	-20℃ 避光保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	粉剂×2 支	-20℃ 避光保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	促进剂 (Accelerant)	0.9 mL×1 支	-20℃ 避光保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 (Chromogenic Agent)	6 mL×1 瓶	-20℃ 避光保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	1 mmol/L 标准品溶液 (1 mmol/L Standard Solution)	0.2 mL×1 支	-20℃ 避光保存 6 个月
	黑色酶标板	96 孔×1 块	无要求
	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)、恒温箱

试剂：PBS(0.01 M, pH 7.4)、1 mol/L 高氯酸、3 mol/L KHCO_3

耗材：pH 试纸

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温(25℃)。

② 试剂二工作液的配制：

按试剂二：试剂一 = 1：34的体积比配制，按需配制，配制好的试剂二工作液可-20℃下避光保存，3天内使用有效。

③ 试剂三工作液的配制：

取一支试剂三用1.4 mL的试剂一溶解，配制好的试剂三工作液可-20℃下避光保存，7天内使用有效。

④ 显色工作液的配制：

按试剂一：试剂四：试剂五 = 9：3：20的体积比配制，按需配制，配制好的显色工作液可-20℃下避光保存，3天内使用有效。

⑤ 100 $\mu\text{mol/L}$ 标准品的配制：

按试剂六：试剂一 = 1：9的体积比配制，避光待用，现配现用，3天内使用有效。

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($\mu\text{mol/L}$)	0	5	10	15	20	50	80	100
100 $\mu\text{mol/L}$ 标准品(μL)	0	10	20	30	40	100	160	200
试剂一(μL)	200	190	180	170	160	100	40	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本：按照血清(浆)：1 mmol/L高氯酸= 4：1的体积比例加入高氯酸涡旋混匀至少1 min，加3 mol/L KHCO_3 调pH至7-8 (初始体积推荐60 μL ，加入 KHCO_3 调pH产气剧烈，请小心缓慢滴加)，4°C，10000 × g，离心10 min后取上清放置在冰盒上备用(上述用酸碱处理样本的过程稀释倍数需要根据 KHCO_3 加入的具体量计算，如按照400 μL 样本加100 μL 1 mmol/L高氯酸混匀后加入60 μL 的3 mol/L KHCO_3 调pH至7-8，则稀释倍数 f_1 为样本加酸碱总体积/样本体积 = 560/400 = 1.4)。

组织样本：按照组织样本质量(g)：0.01 mol/L PBS(0.01 M，pH 7.4)体积(mL)=1：9的比例匀浆，4°C，10000 × g离心10 min后取上清，按照上清液：1 mmol/L高氯酸 = 4：1的比例加入高氯酸涡旋混匀至少1 min，加3 mol/L KHCO_3 调pH至7-8 (初始体积推荐60 μL ，加入 KHCO_3 调pH产气剧烈，请小心缓慢滴加)，4°C，10000 × g，离心10 min后取上清放置在冰盒上备用(上述用酸碱处理样本的过程稀释倍数需要根据 KHCO_3 加入的具体量计算，如按照400 μL 样本加100 μL 1 mmol/L高氯酸混匀后加入60 μL 的3 mol/L KHCO_3 调pH至7-8，则稀释倍数 f_1 为样本加酸碱总体积/样本体积 = 560/400 = 1.4)。

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：0.63-100 $\mu\text{mol/L}$ ，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝组织	不稀释	10%小鼠肺组织	不稀释
10%小鼠肾组织	不稀释	10%小鼠心脏组织	不稀释
10%小鼠脑组织	不稀释	10%小鼠脾脏组织	不稀释
小鼠血清	不稀释	小鼠血浆	不稀释

注：稀释液为 PBS(0.01 M，pH 7.4)。

操作步骤

- ① 标准孔：取 20 μL 不同浓度的标准品溶液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的标准孔和测定孔中加入 70 μL 试剂二工作液。
向步骤①的对照孔中加入 70 μL 试剂一。
- 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 80 μL 显色工作液。
- ⑤ 振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min 后荧光酶标仪在激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 下检测各孔荧光值 F。

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
试剂二工作液(μL)	70	70	--
试剂一(μL)	--	--	70
试剂三工作液(μL)	20	20	20
显色工作液(μL)	80	80	80
振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min 后荧光酶标仪在激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 下检测各孔荧光值 F。			

结果计算

标准曲线: $y = ax + b$

血清(浆)样本中磷酸二羟丙酮(DHAP)含量计算公式:

$$\begin{array}{l} \text{DHAP 含量} \\ (\mu\text{mol/L}) \end{array} = (\Delta F - b) \div a \times f_1 \times f$$

组织样本中磷酸二羟丙酮(DHAP)含量计算公式:

$$\begin{array}{l} \text{DHAP 含量} \\ (\mu\text{mol/kg wet weight}) \end{array} = (\Delta F - b) \div a \div m \times V \times f_1 \times f$$

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 ($\Delta F = F_{\text{测定}} - F_{\text{对照}}$)

f_1 : 样本处理过程的稀释倍数, 按照样本处理部分的公式计算

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

m: 样本质量, kg

V: 加入的提取液的体积, L

附录1 关键数据

1. 技术参数

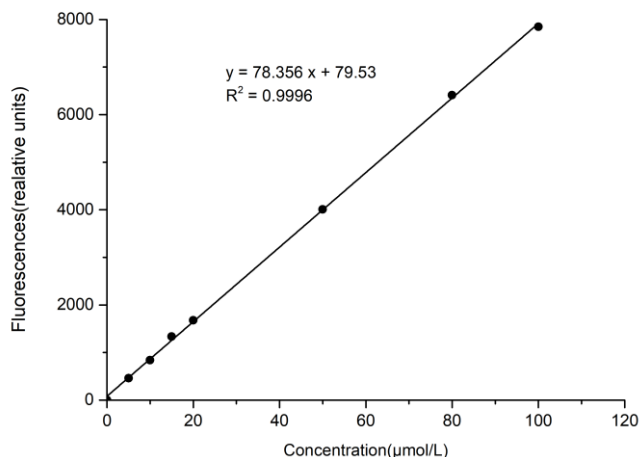
检测范围	0.63-100 $\mu\text{mol/L}$	批间差	1.9-4.7%
灵敏度	0.63 $\mu\text{mol/L}$	批内差	1.1-3.3%
加标回收率	94-96%		

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	5	10	15	20	50	80	100
荧光值	910	1356	1731	2256	2567	4876	7161	8607
	906	1381	1767	2231	2599	4959	7473	8899
平均荧光值	908	1368	1749	2244	2583	4917	7317	8753
绝对荧光值	0	460	841	1336	1675	4010	6409	7845

② 绘制标曲(如下图)：



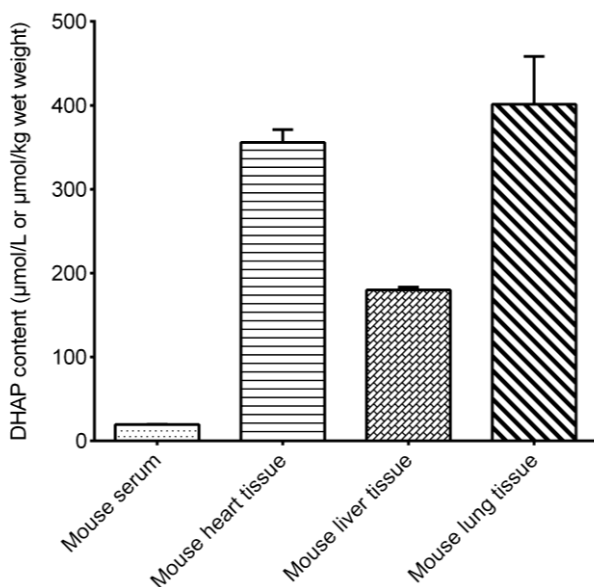
附录2 实例分析

例如小鼠肝组织(数据仅供参考):

取20 μL 10 %小鼠肝组织匀浆上清, 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 78.356x + 79.53$, 测定孔的荧光值 $F_{\text{测定}}$ 为2945, 对照孔的荧光值 $F_{\text{对照}}$ 为1946, $\Delta F = F_{\text{测定}} - F_{\text{对照}} = 2945 - 1946 = 1199$, 计算结果为:

DHAP含量
($\mu\text{mol/kg wet weight}$) = $(1199 - 79.53) \div 78.356 \div 0.0001 \times 0.0009 \times 1.4 = 180 \mu\text{mol/kg wet weight}$

按说明书操作, 测定小鼠血清(加样量20 μL)、10%小鼠心脏组织(加样量20 μL)、10%小鼠肝组织(加样量20 μL)、10%小鼠肺组织(加样量20 μL)中的DHAP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。

