

(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-F024

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 荧光酶标仪(激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm)

Elabscience®黄嘌呤/次黄嘌呤荧光法测试盒

Xanthine/Hypoxanthine 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)、动物组织及细胞样本中黄嘌呤/次黄嘌呤的含量。

检测原理

黄嘌呤和次黄嘌呤是重要的生物碱嘌呤，可用于治疗哮喘和舒张支气管等症状。次黄嘌呤可以被黄嘌呤氧化酶氧化生成黄嘌呤。黄嘌呤被黄嘌呤氧化酶催化生成尿酸，当黄嘌呤氧化酶缺乏时，黄嘌呤会在尿液和血液中积累，诱发高尿酸血症和痛风，最终导致肾功能衰竭。

本测试盒检测原理为：黄嘌呤/次黄嘌呤在酶的催化下生成中间产物，中间产物在其他酶的作用下与探针生成荧光物质，通过荧光值代入标准曲线，可计算样本中黄嘌呤和次黄嘌呤的总含量。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	探针 (Probe)	0.06 mL×1 支	0.12 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	10 mmol/L 标准品 (10 mmol/L Standard)	0.2 mL×1 支	0.4 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	黑色酶标板	96 孔×1 块		无要求
	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)、恒温箱

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)

耗材：10KD 超滤管(外管 1.5 mL，内管 0.5 mL)

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：

取一支试剂二粉剂用550 μL 双蒸水溶解混匀，未使用完的试剂二工作液可-20℃避光保存7天。

③ 反应工作液的配制：

将试剂一：试剂二工作液：试剂三=180：10：1体积比混匀，避光待用，现配现用，半小时内使用有效。

④ 50 $\mu\text{mol/L}$ 标准品的配制：

将试剂一：试剂四=199：1体积比混匀，避光待用，现配现用，8 h内使用有效。

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($\mu\text{mol/L}$)	0	2.5	5	10	20	30	40	50
50 $\mu\text{mol/L}$ 标准品(μL)	0	10	20	40	80	120	160	200
试剂一(μL)	200	190	180	160	120	80	40	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本：取血清(浆)于10 KD超滤管中超滤，4℃，12000 × g，离心25 min，取下层滤管中的滤液置于冰盒上待测。

组织样本：按组织样本质量(g)：试剂一(mL) = 1：9的比例进行匀浆，例如，0.1 g小鼠肝组织，加入0.9 mL试剂一匀浆。4℃，10000 × g离心10 min，取上清于10 KD超滤管中超滤，4℃，12000 × g，离心25 min，取下层滤管中的滤液置于冰盒上待测。

细胞样本：取 1×10^6 个细胞加入200 μ L试剂一进行匀浆，4℃，10000 × g离心10 min，取上清于10 KD超滤管中超滤，4℃，12000 × g，离心25 min，取下层滤管中的滤液置于冰盒上待测。

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：0.10-50 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
人血清	2-20	10%大鼠肝组织	5-10
大鼠血清	不稀释	10%大鼠心组织	8-20
10%大鼠肾组织	5-20	10%大鼠脾组织	8-20
10%大鼠脑组织	2-10	1×10^6 个 HL-60 细胞	不稀释
10%大鼠肺组织	不稀释	1×10^6 个 293T 细胞	不稀释

注：稀释液为试剂一。

操作步骤

- ① 标准孔:取 10 μL 不同浓度的标准品溶液, 分别加入相应的酶标孔中。
测定孔: 取 10 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中的各孔中加入 190 μL 反应工作液。
- ③ 振板 5 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 荧光酶标仪设置激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm, 测定各孔荧光值。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	10	--
待测样本(μL)	--	10
反应工作液(μL)	190	190
振板 5 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 荧光酶标仪设置激发波长 535 nm, 发射波长 587 nm, 测定各孔荧光值。		

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

① 血浆(清)样本中黄嘌呤/次黄嘌呤含量计算公式:

$$\text{黄嘌呤/次黄嘌呤含量} = (\Delta F - b) \div a \times f$$

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

② 组织样本中黄嘌呤/次黄嘌呤含量计算公式:

$$\text{黄嘌呤/次黄嘌呤含量} = (\Delta F - b) \div a \times V \div m \times f$$

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

③ 细胞样本中黄嘌呤/次黄嘌呤含量计算公式:

$$\text{黄嘌呤/次黄嘌呤含量} = (\Delta F - b) \div a \times V \div n \times f \times 1000$$

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

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 : 样本测定孔绝对荧光值: $F_{\text{测定}} - F_{\text{空白}}$

V: 加入的试剂一体积, L

m: 样本质量, kg

n: 细胞样本的个数/ 10^6 个

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

1000: $1 \mu\text{mol/L} = 1000 \text{ nmol/L}$

附录1 关键数据

1. 技术参数

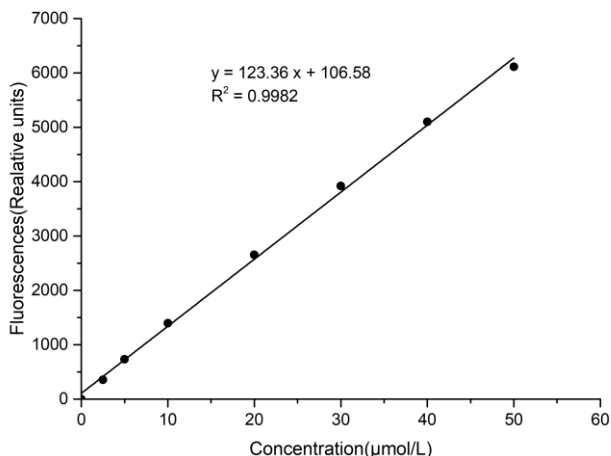
检测范围	0.10-50 $\mu\text{mol/L}$	批间差	2.9-8.3%
灵敏度	0.10 $\mu\text{mol/L}$	批内差	0.4-3.2%
加标回收率	97-105%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量10 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	2.5	5	10	20	30	40	50
荧光值	813	1168	1532	2185	3432	4668	5930	6954
	821	1175	1570	2245	3514	4812	5907	6908
平均荧光值	817	1172	1551	2215	3473	4740	5919	6931
绝对荧光值	0	355	734	1398	2656	3923	5102	6114

② 绘制标曲(如下图)：



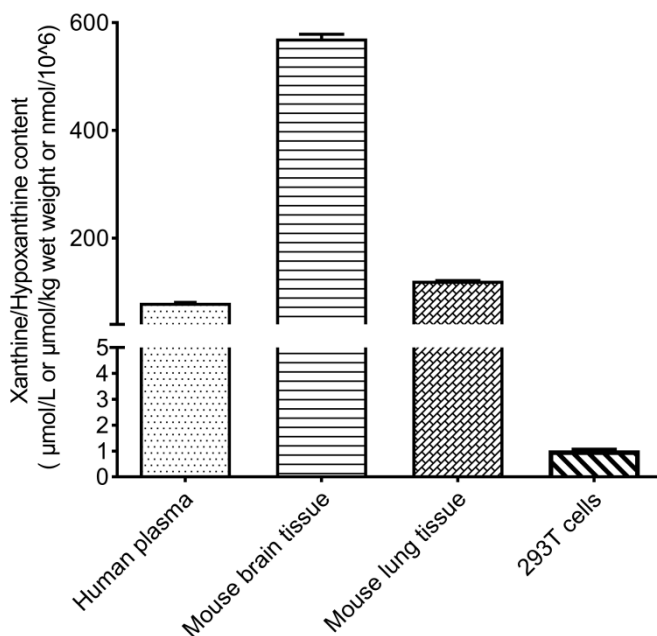
附录2 实例分析

例如检测小鼠脑组织(数据仅供参考):

取 10 μL 超滤后稀释 2 倍的 10%小鼠脑组织样本匀浆上清, 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 147.48x - 192.55$, 空白孔荧光值为 683, 测定孔荧光值为 5213, $\Delta F = F_{\text{测定}} - F_{\text{空白}} = 5213 - 683 = 4530$, 计算结果为:

$$\text{黄嘌呤/次黄嘌呤含量}(\mu\text{mol/kg wet weight}) = (4530 + 192.55) \div 147.48 \times 0.0009 \div 0.0001 \times 2 = 576.39 \mu\text{mol/kg wet weight}$$

按照说明书操作, 测定人血浆(稀释2倍, 加样量10 μL), 小鼠脑组织(10%组织匀浆稀释2倍, 加样量10 μL)、小鼠肺组织(10%组织匀浆稀释2倍, 加样量10 μL)、293T细胞(1×10^6 个, 加样量10 μL)中黄嘌呤/次黄嘌呤含量(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。

