

(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-K846-M

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(430 - 470 nm)

Elabscience® 苯丙氨酸(Phe)比色法测试盒

Phenylalanine (Phe) Colorimetric 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)、尿液、动植物组织、细胞及细胞上清等样本中的苯丙氨酸(Phe)含量。

检测原理

苯丙氨酸(Phenylalanine, Phe), 化学名称为 2-氨基-3-苯丙酸, 是一种参与多种生物合成过程的必需氨基酸。在体内大部分苯丙氨酸经苯丙氨酸羟化酶催化作用氧化成酪氨酸, 并与酪氨酸一起合成重要的神经递质和激素, 参与机体糖代谢和脂肪代谢。Phe 可在酶的作用下与显色剂产生显色物质, 在 450 nm 有最大吸收峰, 测定该显色物质在 450 nm 处的 OD 值可计算样本的 Phe 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)	13 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	0.11 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	加速剂 (Accelerant)	粉剂×4 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 (Substrate)	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 (Chromogenic Solution)	2.4 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	10 mmol/L 标准品溶液 (10 mmol/L Standard Solution)	0.24 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板		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：酶标仪(430-470 nm，最佳检测波长: 450 nm)、涡旋混匀仪

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)

耗材：10 KD 超滤管

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25℃。

② 对照工作液的配制：

取一支试剂三，用3 mL试剂一溶解混匀，现配现用，当天使用有效。

③ 测定工作液的配制：

取一支试剂四，用3 mL对照工作液溶解混匀，现配现用，当天使用有效。

④ 500 $\mu\text{mol/L}$ 标准品的配制：

取50 μL 试剂六，加入950 μL 双蒸水稀释混匀，未使用的溶液2-8℃避光可保存一周。

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 ($\mu\text{mol/L}$)	0	100	200	250	300	350	400	500
500 $\mu\text{mol/L}$ 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

液体样本：使用10 KD超滤管4℃ 12000 ×g离心15 min，收集滤液，每200 μL滤液样本，加入1 μL试剂二，25℃静置10 min，置于冰上待测。

组织样本：按照组织质量(g)与生理盐水(0.9% NaCl)体积(mL)=1: 9的比例进行匀浆，4℃，10000 ×g离心10 min，取上清液，使用10 KD超滤管4℃ 12000 ×g离心15 min，收集滤液，每200 μL滤液样本，加入1 μL试剂二，25℃静置10 min，置于冰上待测。

细胞样本：取 1×10^6 个细胞，加入200 μL生理盐水(0.9% NaCl)匀浆，4℃，10000 ×g离心10 min，取上清液，使用10 KD超滤管4℃ 12000 ×g离心15 min，收集滤液，每200 μL滤液样本，加入1 μL试剂二，25℃静置10 min，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：4.25-500.00 μmol/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	2-4	10%小鼠胃组织	2-3
10%桃子果肉组织	不稀释	人血清	2-4
大鼠血浆	2-3	兔血清	2-3
1×10^6 个 Jurkat 细胞	不稀释	1×10^6 个小鼠脾细胞	不稀释
Jurkat 细胞上清	2-4	小鼠脾细胞上清	2-4

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加入到相应的酶标孔中。
测定孔：取 20 μL 待测样本，加入到相应的酶标孔中。
对照孔：取 20 μL 待测样本，加入到相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中各孔加入 20 μL 试剂五。
- ③ 向步骤②中标准孔和测定孔加入 100 μL 测定工作液。
- ④ 向步骤②中对照孔加入 100 μL 对照工作液。
- ⑤ 振板 5 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 使用酶标仪于 450 nm 检测各孔的 OD 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
试剂五(μL)	20	20	20
测定工作液(μL)	100	100	--
对照工作液(μL)	--	--	100
振板 5 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 使用酶标仪于 450 nm 检测各孔的 OD 值。			

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

液体样本中苯丙氨酸(Phe)含量计算公式:

$$\text{Phe 含量} = \frac{\Delta A - b}{a} \times f$$

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

组织样本中苯丙氨酸(Phe)含量计算公式:

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

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

细胞样本中苯丙氨酸(Phe)含量计算公式:

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

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

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA : 样本的绝对 OD 值(测定孔 OD 值-对照孔 OD 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

附录1 关键数据

1. 技术参数

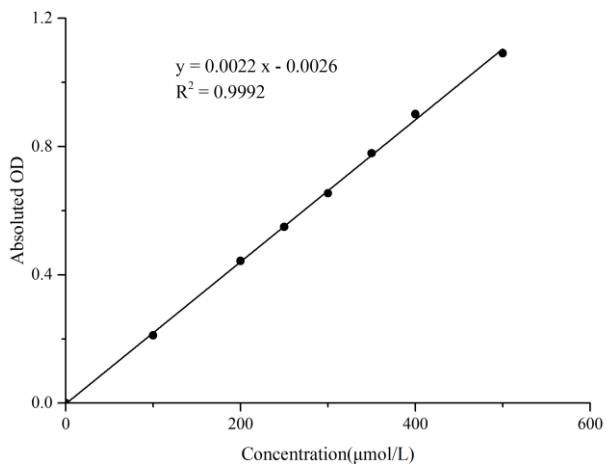
检测范围	4.25-500.00 $\mu\text{mol/L}$	批间差	2.4-4.0%
灵敏度	4.25 $\mu\text{mol/L}$	批内差	0.9-1.6%
加标回收率	95-97%		

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, OD值如下表所示:

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	100	200	250	300	350	400	500
OD 值	0.154	0.364	0.600	0.707	0.811	0.933	1.053	1.236
	0.149	0.361	0.590	0.695	0.800	0.928	1.053	1.249
平均 OD 值	0.152	0.363	0.595	0.701	0.806	0.931	1.053	1.243
绝对 OD 值	0	0.211	0.444	0.550	0.654	0.779	0.902	1.091

② 绘制标曲(如下图):



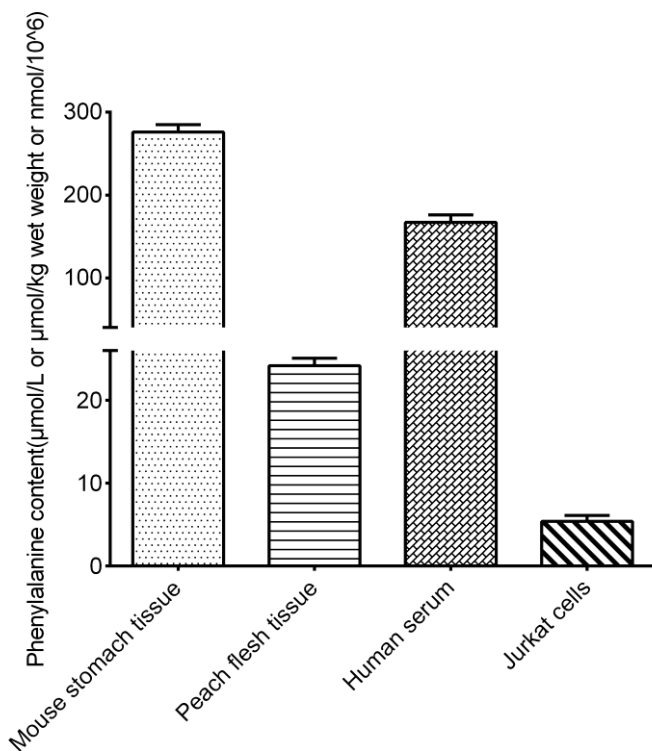
附录2 实例分析

例如检测人血清(数据仅供参考):

取20 μL 稀释2倍的处理后的人血清超滤液, 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 0.0022x - 0.0026$, 测定孔平均OD值为0.879, 对照孔平均OD值为0.698, 计算结果为:

$$\text{Phe含量}(\mu\text{mol/L}) = (0.879 - 0.698 + 0.0026) \div 0.0022 \times 2 = 166.91 \mu\text{mol/L}$$

按说明书操作, 测定小鼠胃组织(稀释2倍, 加样量20 μL)、桃子果肉组织(稀释2倍, 加样量20 μL)、人血清(稀释2倍, 加样量20 μL)、Jurkat细胞(1×10^6 个, 加样量20 μL)的Phe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。

