

(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-F079

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®鞘磷脂(SM)荧光法测试盒

Sphingomyelin (SM) 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)、动物组织以及细胞样本中鞘磷脂(SM)的含量。

检测原理

鞘磷脂(Sphingomyelin, SM)广泛存在于细胞膜和血浆脂蛋白中。SM 的代谢由鞘磷脂合酶和鞘磷脂酶调控, 其代谢产物包括神经酰胺、鞘氨醇和磷酸胆碱, 这些代谢产物是重要的第二信使。研究表明, SM 及其代谢产物在肝脏、肺部以及心血管疾病中都扮演着重要角色。本试剂盒的作用原理是 SM 被鞘磷脂酶催化分解, 其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 SM 含量。

本试剂盒检测动物组织或细胞样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

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)	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	提取液 (Extraction Solution)	25 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 A (Enzyme Reagent A)	0.02 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶试剂 B (Enzyme Reagent B)	0.05 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	酶试剂 C (Enzyme Reagent C)	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	探针 (Probe)	0.2 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	1 mmol/L 标准品 (1 mmol/L Standard)	0.5 mL×1 支	-20°C 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(激发波长为 535 nm，发射波长为 587 nm)、37°C 恒温箱

试剂准备

① 检测前, 试剂三、试剂四和试剂五置于冰盒上待用, 其余试剂需平衡至25°C。

② 试剂三工作液的配制:

按试剂一: 试剂三: 试剂四体积比为1000: 1: 5混匀。例如, 取2 μL 试剂三, 加入10 μL 试剂四, 用2 mL试剂一稀释并混匀, 即得到试剂三工作液, 置于冰上备用。按需配制, -20°C避光可保存1天。

③ 试剂四工作液的配制:

按试剂一: 试剂四体积比为1000: 5混匀。例如, 取10 μL 试剂四, 用2 mL试剂一稀释并混匀, 即得到试剂四工作液, 置于冰上备用。按需配制, -20°C避光可保存1天。

④ 工作液的配制:

取一支试剂五, 加入84 μL 的双蒸水充分溶解, 配制成试剂五工作液, 当天有效。按试剂一: 试剂五工作液: 试剂六体积比为2000: 28: 30混匀。例如, 取28 μL 试剂五工作液, 加入2 mL试剂一和30 μL 试剂六, 混匀, 即得到工作液, 置于冰上备用。按需配制, 30 min内有效。

⑤ 50 $\mu\text{mol/L}$ 标准品的配制:

按试剂七: 双蒸水体积比为1: 19混匀, 现配现用, 当天有效。

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	20	25	30	35	40
50 $\mu\text{mol/L}$ 标准品(μL)	0	20	40	80	100	120	140	160
双蒸水(μL)	200	180	160	120	100	80	60	40

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本：可直接测定。

组织样本：按组织样本质量(g)：试剂二体积(mL)=1:9的比例进行匀浆，例如，0.1 g小鼠脑组织，加入0.9 mL试剂二，4°C，10000 ×g离心10 min后取上清待测，需留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本：取 1×10^6 个细胞离心后弃上清，每次加入 200 μ L 生理盐水(0.9% NaCl)，清洗三次。清洗完成后再加入 200 μ L 试剂二，混匀后放置在冰盒上裂解 10 min，每隔 5 min 上下颠倒混匀，4°C，10000 ×g 离心 10 min 后取上清待测，需留取部分上清进行蛋白浓度测定。

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：0.35-40 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
10%小鼠肝组织	15-20	大鼠血浆	80-100
10%小鼠脑组织	15-20	1×10^6 个 Jurkat 细胞	不稀释
人血清	80-100	1×10^6 个 293T 细胞	不稀释
胎牛血清	80-100	1×10^6 个 HL-60 细胞	不稀释
小鼠血浆	80-100	1×10^6 个 HeLa 细胞	1-2

注：稀释液为试剂二。

实验关键点

- ① 试剂三、试剂四、试剂五体积较少，使用前离心。
- ② 工作液使用前配制，放置时间不宜过长，否则背景荧光值过高，影响实验结果。
- ③ 配制不同浓度标准品时可适当离心混匀，注意观察标准品应为透明液体，如有絮状沉淀析出，可超声至溶液完全溶解。

④ 加样完成后，可稍微振荡酶标板使反应试剂混合均匀。

操作步骤

- ① 标准孔：取 20 μL 不同浓度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中的标准孔、测定孔中加入 80 μL 试剂三工作液；
向步骤①中的对照孔中加入 80 μL 试剂四工作液。
- ③ 向步骤②中的标准孔、测定孔、对照孔中加入 100 μL 工作液。
- ④ 振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 40 min，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
不同浓度的标准品溶液(μL)	20	--	--
样本(μL)	--	20	20
试剂三工作液(μL)	80	80	--
试剂四工作液(μL)	--	--	80
工作液(μL)	100	100	100
振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育 40 min，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。			

本试剂盒检测动物组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

血清(浆)样本中鞘磷脂(SM)含量计算公式：

$$\text{SM 含量} \begin{matrix} (\mu\text{mol/L}) \end{matrix} = (\Delta F - b) \div a \times f$$

组织和细胞样本中鞘磷脂(SM)含量计算公式：

$$\text{SM 含量} \begin{matrix} (\mu\text{mol/gprot}) \end{matrix} = (\Delta F - b) \div a \div C_{\text{pr}} \times f$$

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 : 样本测定孔变化荧光值: $F_{\text{测定}} - F_{\text{对照}}$

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} : 待测样本的蛋白浓度, gprot/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

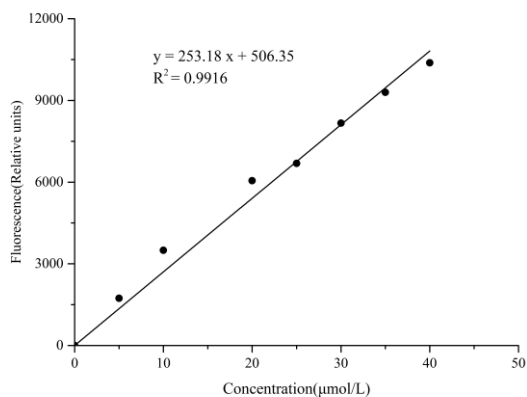
检测范围	0.35-40 $\mu\text{mol/L}$	批间差	6.0-10.0%
灵敏度	0.35 $\mu\text{mol/L}$	批内差	4.9-5.1%
加标回收率	100-104%		

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	20	25	30	35	40
荧光值	1051	2763	4431	7041	7567	9063	10193	11232
	1022	2778	4637	7139	7885	9348	10476	10476
平均荧光值	1037	2771	4534	7090	7726	9206	103349	11420
绝对荧光值	0	1734	3497	6054	6689	8169	9298	10384

② 绘制标准曲线(如下图)：



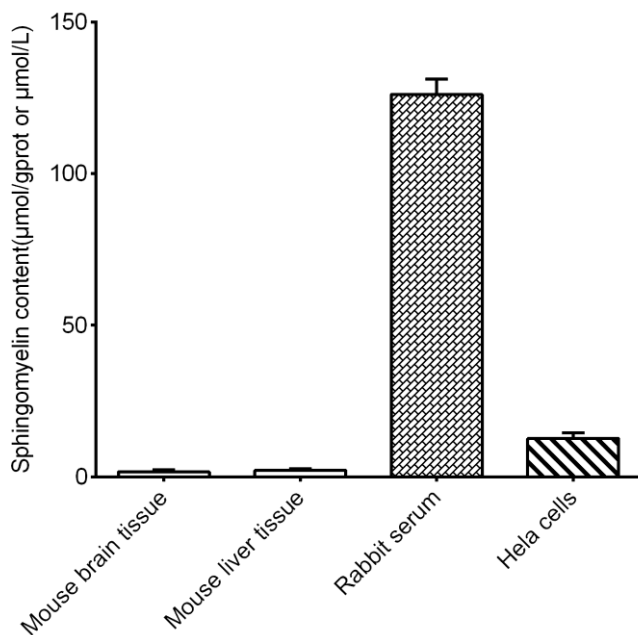
附录2 实例分析

例如检测小鼠脑组织(数据仅供参考):

取20 μL 稀释20倍的10%小鼠脑组织上清液,按操作表操作,结果如下:
标准曲线: $y = 362.63x + 370.99$, 测定孔平均荧光值 $F_{\text{测定}}$ 为6002, 对照孔平均
荧光值 $F_{\text{对照}}$ 为5426, $\Delta F = F_{\text{测定}} - F_{\text{对照}} = 6002 - 5426 = 576$, 10%小鼠脑组织匀
浆蛋白浓度为6.78 $\mu\text{gprot/L}$ 计算结果为:

$$\text{SM含量}(\mu\text{mol/gprot}) = (576 - 370.99) \div 362.63 \times 20 \div 6.78 = 1.67 \mu\text{mol/gprot}$$

按说明书操作,测定小鼠脑组织(10%组织匀浆蛋白浓度为6.78 $\mu\text{gprot/L}$,
稀释20倍,加样量20 μL)、小鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度10.08 $\mu\text{gprot/L}$,
稀释20倍,加样量20 μL)、兔血清(稀释100倍,加样量20 μL)、Hela细胞(1×10^6
个细胞匀浆蛋白浓度0.70 $\mu\text{gprot/L}$,加样量为20 μL)中的SM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。

