

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ237

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：酶标仪(630-640 nm)

Elabscience®蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP-1B)比色法 测试盒

Protein Tyrosine Phosphatase-1B (PTP-1B) Activity 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动(植)物组织及细胞样本中的蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP-1B)的活力。

检测原理

蛋白酪氨酸磷酸化酶(Protein Tyrosine Phosphatase-1B, PTP-1B)属于蛋白质酪氨酸磷酸酶家族，专一水解芳香族磷酸，通过对胰岛素受体或其底物上的酪氨酸残基去磷酸化作用，对胰岛素信号转导进行负调节。

本试剂盒的检测原理是：PTP-1B 通过去磷酸化作用，产生的磷酸根与孔雀石绿形成显色物质，通过测定 636 nm 处的吸光度变化来测定样本中 PTP-1B 的活力。

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)	55 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	还原剂 (Reducing Reagent)	5 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	粉剂×2 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	24 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	8 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	蛋白沉淀剂 (Protein Precipitator)	60 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	1 mmol/L 标准品溶液 (1 mmol/L Standard Solution)	1 mL×1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	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：酶标仪(630-640 nm，最佳检测波长 636 nm)，恒温箱

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25℃。

② 提取液的配制：

将试剂一：试剂二按体积比= 9：1配制，避光待用，未用完的提取液可2-8℃避光保存3天。

③ 反应工作液的配制：

取1瓶试剂三，加入3 mL双蒸水，混合均匀，未用完的反应工作液可-20℃避光保存10天。

④ 显色工作液的配制：

将试剂四：试剂五：双蒸水按体积比= 3：1：4配制，配制好的显色工作液37℃孵育1 h，按需配制，25℃避光保存，当天使用完毕(试剂四使用时可能有胶状物质，可在90℃下加热至无胶状物质)。

⑤ 200 μmol/L标准品的配制：

将试剂七：双蒸水按体积比= 1：4配制，混匀，未使用完的试剂-20℃可保存1个月。

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

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照组织样本质量(g)：提取液体积(mL)= 1:9的比例匀浆(如 0.05 g组织样本，加入0.45 mL提取液)。4℃，10000 × g离心10 min，取上清置于冰盒待测，制备好的上清在4 h内完成检测。

细胞样本：按照约 1×10^6 个细胞：提取液体积(μ L)=1:200比例匀浆(如 1×10^6 个细胞，加入200 μ L提取液)。4℃，10000 × g离心10 min，取上清置于冰盒待测，制备好的上清在4 h内完成检测。

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：0.216 - 7.200 U/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%小鼠脑组织	不稀释
10%小鼠肾组织	不稀释	10%绿萝叶组织	不稀释
10%大鼠肺组织	不稀释	1×10^6 个 Jurkat 细胞	不稀释

注：稀释液为提取液。

实验关键点

- ① 实验时小心操作，所用实验器具需多次冲洗(10 次左右)，避免外部磷污染。
- ② 若测定孔 OD 值大于 1.30 时，将孵育反应步骤④上清液与试剂六按比例稀释，再进行显色反应。
- ③ 操作孵育和显色步骤时，小心吸取 EP 管上清液进行测定，请勿吸收到沉淀。
- ④ PTP-1B 活力会随时间降低，建议样本匀浆后 4h 内测定。

操作步骤

孵育反应

- ① 测定管：取 20 μL 待测样本加入至 1.5 mL 的 EP 管。
对照管：取 20 μL 待测样本加入至 1.5 mL 的 EP 管。
- ② 向步骤①中的测定管加入 100 μL 反应工作液
向步骤①中的对照管加入 100 μL 试剂一。
- ③ 37°C 孵育 1 h。
- ④ 向步骤③中的各管中加入 600 μL 试剂六，10000 $\times g$ 离心 10 min，取上清液在 25°C 待用。

显色反应

- ① 标准孔：取 20 μL 不同浓度的标准品溶液，分别加入相应的酶标板孔。
测定孔：取 20 μL 测定管上清液加入相应的酶标板孔中。
对照孔：取 20 μL 对照管上清液加入相应的酶标板孔中。
- ② 向步骤①中的各孔加入 200 μL 显色工作液。
- ③ 振板 5 s，37°C 避光孵育 20 min，酶标仪于 636 nm 测定各孔 OD 值。

操作表

孵育反应

	测定管	对照管
待测样本(μL)	20	20
反应工作液(μL)	100	--
试剂一(μL)	--	100
37℃ 孵育 1 h。		
试剂六(μL)	600	600
各管 10000 × g 离心 10 min，取上清液在 25℃ 待用。		

显色反应

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	20	--	--
测定管上清液(μL)	--	20	--
对照管上清液(μL)	--	--	20
显色工作液(μL)	200	200	200
振板 5 s，37℃ 避光孵育 20 min，酶标仪于 636 nm 处测定各孔 OD 值。			

注：若测定孔 OD 值大于 1.30 时，将孵育反应步骤④上清液与试剂六按比例稀释，再进行显色反应。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

① 组织样本中蛋白酪氨酸磷酸化酶(PTP-1B)酶活计算公式:

定义: 37°C 条件下, 每千克组织在每升反应体系中每小时产生 1 mmol 磷酸盐所需要的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{PTP-1B 酶活 (U/kg wet weight)} = (\Delta A_{636} - b) \div a \times \frac{V_1}{V_2} \div \frac{m}{V_3} \times f \div T \div 1000^*$$

② 细胞样本中蛋白酪氨酸磷酸化酶(PTP-1B)酶活计算公式:

定义: 37°C 条件下, 每 10^6 个细胞在每升反应体系中每小时产生 1 μmol 磷酸盐所需要的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{PTP-1B 酶活 (U/10^6)} = (\Delta A_{636} - b) \div a \times \frac{V_1}{V_2} \div \frac{n}{V_3} \times f \div T \div 1000^*$$

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_{636} : 绝对 OD 值, 样本测定 OD 值 - 对照 OD 值

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

m: 组织湿重质量, g

n: 细胞样本数量, 10^6

V_1 : 孵育反应总体积, 0.72 mL

V_2 : 待测样本上样体积, 0.02 mL

V_3 : 匀浆介质提取液体积, mL

T: 孵育反应时间, 1 h

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

附录 1 关键数据

1. 技术参数

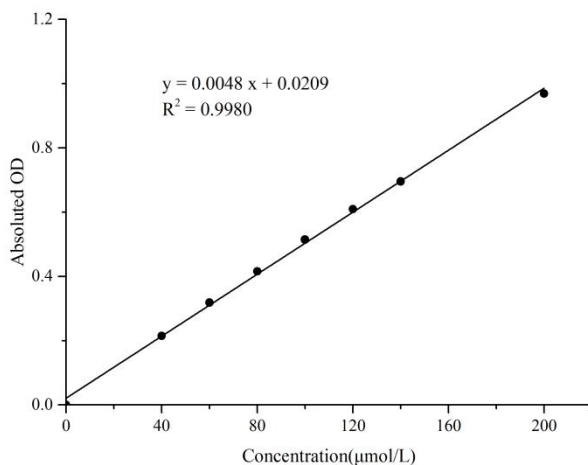
检测范围	0.216-7.200 U/L	批间差	7.5-10.0%
灵敏度	0.216 U/L	批内差	2.0-2.1%
加标回收率	95-107%		

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	40	60	80	100	120	140	200
OD 值	0.305	0.524	0.632	0.729	0.829	0.919	1.006	1.279
	0.308	0.519	0.618	0.715	0.813	0.913	0.998	1.272
平均 OD 值	0.307	0.522	0.625	0.722	0.821	0.916	1.002	1.276
绝对 OD 值	0	0.215	0.319	0.416	0.515	0.610	0.696	0.969

② 绘制标曲(如下图):



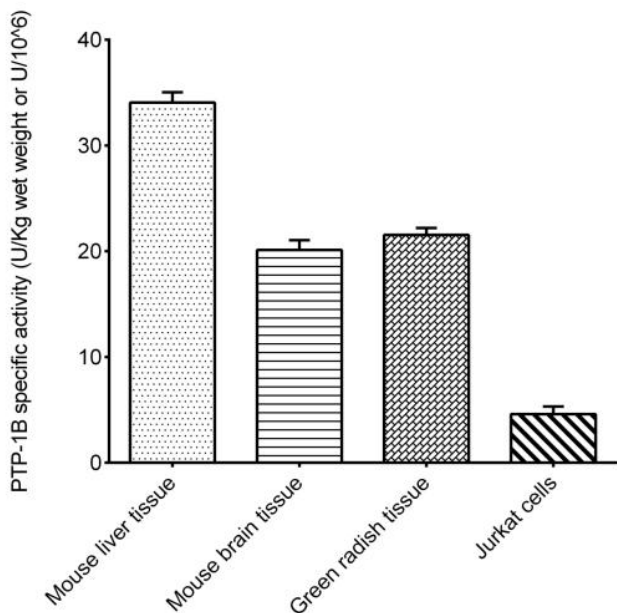
附录2 实例分析

例如小鼠肝组织(数据仅供参考):

取20 μL 的10%小鼠肝组织匀浆上清液加入到酶标板孔中,按操作表操作,结果如下: 标准曲线: $y = 0.0048x + 0.0209$, 测定孔OD值为0.930, 对照孔OD值为0.623, $\Delta A_{636} = 0.930 - 0.623 = 0.307$, 计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{PTP-1B酶活} &= (0.307 - 0.0209) \div 0.0048 \times \frac{0.72}{0.02} \div \frac{0.1}{0.9} \div 1000 \\ (\text{U/kg wet weight}) &= 19.31 \text{ U/kg wet weight} \end{aligned}$$

按说明书操作, 测定小鼠肝组织(10%组织匀浆, 加样量20 μL)、小鼠脑组织(10%组织匀浆, 加样量20 μL)、绿萝叶组织(10%组织匀浆, 加样量20 μL)、Jurkat细胞(1×10^6 个, 加样量20 μL)中的PTP-1B活力(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。

