

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ049

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 GBQ162)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	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℃。

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℃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℃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℃，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 1×10⁶ 个细胞离心后弃上清，每次加入 200 μL 生理盐水 (0.9% NaCl)，清洗三次。清洗完成后再加入 200 μL 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℃，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 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	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°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°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 GBQ162)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

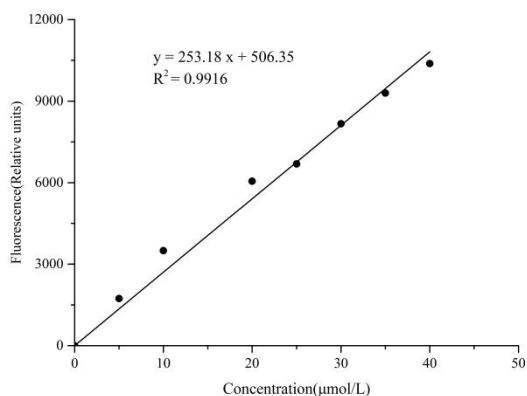
检测范围	0.35-40 $\mu\text{mol/L}$	批间差	6.0-10.0%
灵敏度	0.35 $\mu\text{mol/L}$	批内差	4.9-5.1%
加标回收率	100-104%		

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	10334.9	11420
绝对荧光值	0	1734	3497	6054	6689	8169	9298	10384

② 绘制标准曲线(如下图)：



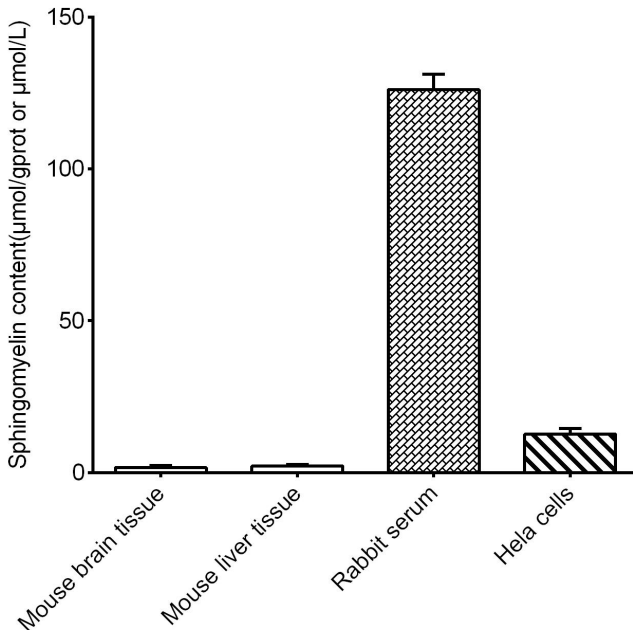
附录2 实例分析

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 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 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 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 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。

