

同型半胱氨酸 (HCY) (酶循环法) 检测试剂盒说明书

(微板法48样)

一、产品简介:

氧化型同型半胱氨酸经三乙羧乙基膦 (TCEP) 还原形成游离型 HCY, 游离型 HCY 与底物反应循环放大, 同时产生腺苷。腺苷立即水解成氨和次内嘌呤, 氨在谷氨酸脱氢酶的作用下, 使 NADH 转换成 NAD⁺, 通过检测反应中 NADH 于340nm处下降速率, 进而计算出 HCY的含量。

二、试剂盒组分与配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体8mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	液体2.5mL×1支	4℃保存	
标准管	液体0.2mL×1支	4℃保存	浓度为28 μmol/L。

三、所需仪器和用品:

酶标仪、96孔板、可调式移液器、离心机、蒸馏水。

四、同型半胱氨酸 (HCY) 含量检测:

建议正式实验前选取2个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

①组织样本:

取约0.1g 组织样本, 加1mL 的生理盐水研磨, 粗提液全部转移到EP 管中, 12000rpm, 常温离心10min, 上清液待测。

②液体样品: 澄清的液体可直接检测; 若浑浊则离心后取上清液检测。

2、上机检测:

①酶标仪预热30min, 设置温度在37℃, 设定波长到340nm。

②所有试剂解冻至室温, 在96孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)	标准管 (仅做一次)
样本	10		
蒸馏水		10	
标准品			10
试剂一	150	150	150
混匀, 37℃孵育5min。			
试剂二	40	40	40
混匀, 37℃孵育2min后于340nm处读取吸光值A1, 接着5min后再读取A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。			

【注】: 1. 若5min内的 ΔA 值大于0.4, 须用蒸馏水对样本进行稀释, 稀释倍数D 代入计算公式。

2. 若 ΔA 的值小于0.005, 可增加样本加样体积 V1 (如由10 μL 增至20 μL, 空白管也由10 μL 增至20 μL蒸馏水, 标准管是10 μL标准品和10 μL蒸馏水; 其他试剂均保持不变), 或者读取A1后, 延长至15min后再读取A2。则改变后的V1和 ΔA 和T 代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照质量计算：

$$\text{同型半胱氨酸(HCY)}(\text{nmol/g}) = \frac{C_{\text{标准}} \times V_2 \times (\Delta A_{\text{测}}/T - \Delta A/T) \div (\Delta A_{\text{标准}}/T - \Delta A/T) \div (V_1 \div V \times W) \times D}{= 28 \times (\Delta A/T - \Delta A/T) \div (\Delta A_{\text{标准}}/T - \Delta A/T) \div W \times D}$$

2、按照体积计算：

$$\text{同型半胱氨酸(HCY)}(\mu\text{mol/L}) = \frac{C_{\text{标准}} \times V_2 \times (\Delta A_{\text{测定}}/T - \Delta A/T) \div (\Delta A_{\text{标准}}/T - \Delta A/T) \div V_1 \times D}{= 28 \times (\Delta A_{\text{测定}}/T - \Delta A/T) \div (\Delta A_{\text{标准}}/T - \Delta A/T) \times D}$$

C 标准---标品浓度，28 μmol/L=28nmol/mL;

V1---加入样本体积，0.01mL;

V---提取液体积，1mL;

D---稀释倍数，未稀释即为1。

ΔA/T---每分钟吸光度变化率;

V2---加入标准品体积，0.01mL;

W---质量，g;