

代谢测定试剂盒操作指南

Product manual

武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司
www.elabscience.cn



关注微信公众号

武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司

网址: www.elabscience.cn

电话: 027-87526315

邮箱: biochemical@elabscience.cn

地址: 武汉市东湖新技术开发区高新大道858号生物医药园二期B18栋

生化试剂盒优势

Elabscience企业简介

Elabscience®是一家专注于免疫检测类试剂研发、生产与销售的高科技公司,主要产品为流式抗体、ELISA试剂盒、代谢测定试剂盒、细胞功能检测试剂盒等。公司现拥有23项已授权专利,产品均通过ISO9001国际质量认证及欧盟CE认证,文献引用数量超8000篇,总影响因子达30000+。

目

录

企业简介	01
代谢测定试剂盒优势	02
代谢测定试剂盒产品介绍	03
代谢测定试剂盒选择小技巧	04
常见样本处理	05
代谢测定试剂盒FAQ	09

01

国内首家荧光法测试盒

性价比高,媲美国际知名品牌

02

领域覆盖广

涵盖铁死亡、铜死亡、氧化应激、线粒体功能等11个热门领域

03

样本适用性广

适用于植物、动物组织、细胞、血液(血清/血浆)、尿液等样本,且提供售前样本验证服务

04

说明书

内容详细,提供常见样本稀释比,提高实验效率

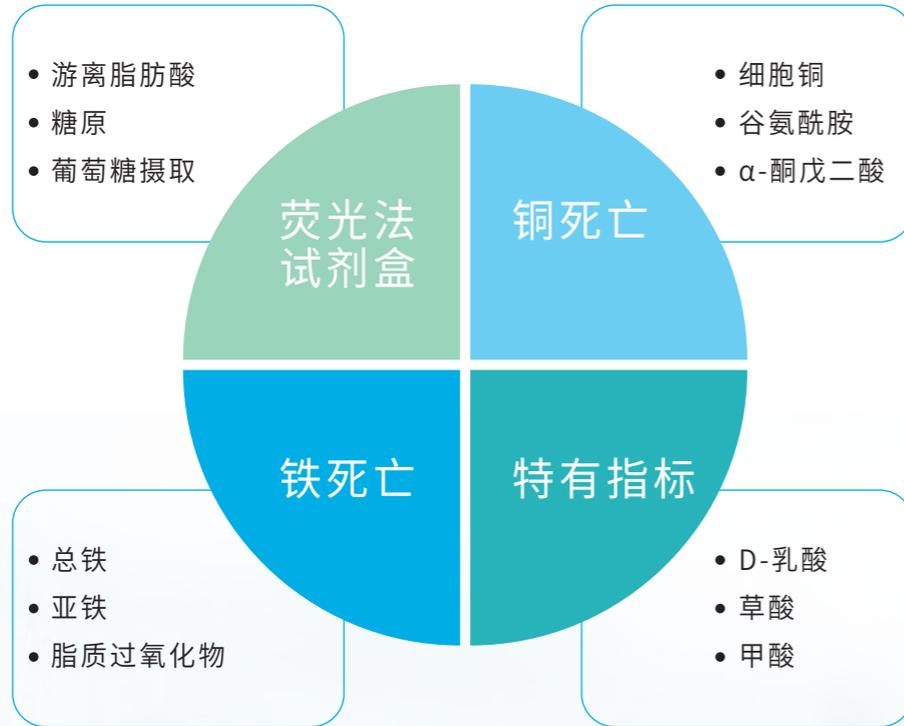
05

文献引用

增长速度快,引用产品的文献被《Cell》、《Immunity》、《Cellular & Molecular Immunology》、《Advanced Functional Materials》、《Natural Metabolism》等顶级期刊收录

代谢测定试剂盒产品介绍

特色系列



常规系列

系列：氧化应激，肝肾功能，三羧酸循环，糖脂代谢，氨基酸蛋白，植物生理，离子系列，代谢疾病



氧化应激



肝肾功能



三羧酸循环



糖脂代谢



氨基酸蛋白



植物生理



离子系列

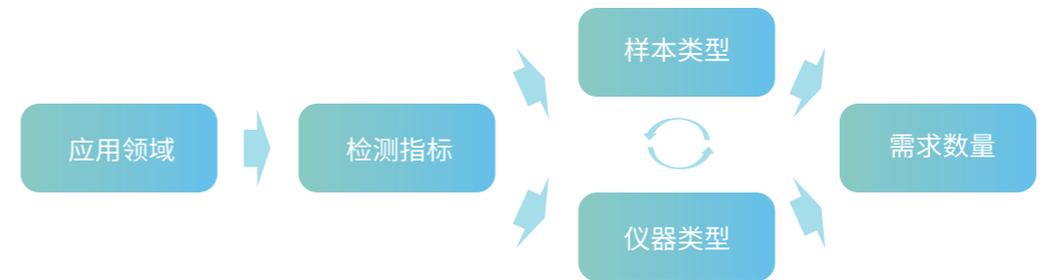


代谢疾病

代谢测定试剂盒选择小技巧

流程

① 确定应用领域 ② 确定检测的指标 ③ 根据适用样本类型或仪器类型选择合适的试剂盒 ④ 根据样本数，确定需要购买的试剂盒数量



小贴士

选择试剂盒前请注意以下问题：

- ① 根据实验设计或文献报道，确认测定哪些指标。测定指标最好是成系列的，这样便于得出明确结论，也利于发表文章。
- ② 注意样本类型、样本数量以及样本保存状况。
- ③ 根据实验室的仪器设备选择相应货号产品。

案例展示：

以研究氧化应激领域，MDA指标为例



● 常见样本处理

▶ 血液类样本的收集及保存

全血

取新鲜血液加入到盛有抗凝剂的管中，轻轻颠倒混匀，充分抗凝，得到全血样本，置于冰上待测。全血样本收集好后，若不能当天检测，4°C可保存1-2天。

血清

取新鲜血液，室温条件下静置30 min，待血液凝结，2000×g离心10 min，取上层淡黄色澄清液体即为血清，置于冰上待测。若暂时不测定，可分装冻存备用，避免反复冻融，一般4°C可保存1-2天，-20°C可保存1周，-80°C可保存1个月。

血浆

取新鲜血液加入到盛有抗凝剂的管中，颠倒混匀，充分抗凝，1000-2000×g离心10 min，取上层淡黄色透明液体即为血浆，置于冰上待测。若暂时不测定，可分装冻存备用，避免反复冻融，一般4°C可保存1-2天，-20°C可保存1周，-80°C可保存1个月。

小贴士

- ① 样本收集过程中需要尽量轻柔，减少摩擦和碰撞；
- ② 血液样本最好无溶血、脂血、黄疸的现象；
- ③ 不要将全血样本进行冻融，一次性收集的血量体积要大一点，不要微量多次收集；
- ④ 收集的全血需尽快处理成血清或血浆，不要存放时间太久；
- ⑤ 制备血浆标本需借助于抗凝剂，不同的指标检测需选择适合的抗凝剂，常用的抗凝剂有肝素的各种盐、EDTA及枸橼酸钠。代谢测定实验一般建议用肝素抗凝。

▶ 细胞及组织样本

细胞上清

直接取细胞上清进行检测，如有杂质或细胞碎片，4°C，3000×g离心10 min，取上清置于冰上待测。

悬浮细胞：

- ① 4°C，1000×g离心10 min收集细胞。
- ② 按照 10^6 个细胞加入200-400 μL匀浆介质，进行超声破碎或机械匀浆（无明显的细胞沉淀，可在显微镜下观察）。
- ③ 4°C，10000×g离心10 min，取上清置于冰上待测。

贴壁细胞：

- ① 吸弃培养液，用冷的PBS（0.01 M，pH 7.4）轻轻将细胞洗一遍，然后用胰蛋白酶消化或细胞刮收集细胞（代谢测定一般建议用细胞刮收集贴壁细胞）。
- ② 加入2-5 mL PBS（0.01 M，pH 7.4），制成细胞悬液，4°C，1000×g离心5分钟后收集细胞。
- ③ 每 10^6 个细胞中加入200-400 μL匀浆介质，进行超声破碎或机械匀浆（无明显的细胞沉淀，可在显微镜下观察）。
- ④ 4°C，10000×g离心10 min，取上清置于冰上待测。

小贴士

- ① 细胞样本保存：细胞样本若暂时不测定，可低温冻存，避免反复冻融。一般-20°C可保存半个月，-80°C可保存1个月。
- ② 特殊指标对样本有较高要求除外。制备好的细胞匀浆最好当天进行测定。

组织样本:

- ① 取0.02-1g新鲜组织，用2-8°C的PBS(0.01 M, pH 7.4)漂洗，去除血液，滤纸拭干，称重，放入匀浆容器中。
- ② 按照组织重量(g): 匀浆介质体积(mL)=1:9的比例加入匀浆介质。
- ③ 低温匀浆。4°C，10000×g离心10 min，取上清置于冰上待测。

小贴士

- ① 组织样本若暂时不测定，可低温冻存，避免反复冻融。一般-20°C可保存半个月，-80°C可保存1个月。特殊指标对样本有较高要求除外。
- ② 制备好的组织匀浆建议不要冻存，最好当天进行测定。

匀浆方式:**① 匀浆介质:**

一般采用PBS (0.01 M, pH 7.4) 或生理盐水 (0.9% NaCl) ，但要注意有些特殊的生化指标，匀浆介质要求不一样，详见具体指标说明书。

② 匀浆方式: 手动匀浆、机械匀浆、超声破碎、反复冻融

手动匀浆: 将样本 (含匀浆介质) 倒入玻璃匀浆管中，匀浆管下端插入盛有冰水混合物的容器中，将捣杆垂直插入匀浆管，上下转动研磨数十次 (6~8分钟) ，使组织或细胞充分匀浆化。

机械匀浆: 将样本 (含匀浆介质) 装入EP管，用机械匀浆机，在低温条件下，60 Hz，90 s研磨，制成组织或细胞匀浆液 (皮肤、肌肉组织及植物组织等可适当延长匀浆时间) 。

超声破碎: 用超声波发生器以振幅14 μm超声处理30 s，使细胞破碎；或者用超声细胞破碎仪，300 W，3~5 s/次，间隙30 s，重复4~5次。

反复冻融: 用匀浆介质重悬细胞，再将细胞悬液进行“冷冻-融化-冷冻”循环，重复3次左右。

(此法会使某些酶活力受影响，因此检测细胞样本的酶活力时不推荐使用反复冻融来破碎细胞)

匀浆的物品如下:

超声细胞破碎仪



组织研磨仪



研钵

▶ 其他样本**尿液**

收集新鲜尿液加入无菌试管中，4°C，10000×g离心15 min，取上清置于冰上待测。

唾液

用清水漱口，30 min后用唾液采集器收集唾液。在2-8°C下，10000×g离心15 min，取上清置于冰上待测。建议使用新鲜的唾液样本检测。

胸水

收集新鲜胸水加入含有抗凝剂的试管中，颠倒混匀，4°C，10000×g离心10 min，取上清置于冰上待测。

乳汁

取新鲜乳汁，4°C，10000×g离心10 min，弃去白色上层，取中层清液置于冰上待测。

精液

将精液样本于冰水浴条件下，机械匀浆，破碎细胞，或者用细胞破碎仪，100 W，2 s/次，间歇3 s，总时间5 min，破碎细胞，然后于4°C，10000×g离心10 min，取上清待测。

代谢测定试剂盒FAQ

▶ 预实验方法怎么做？为什么要做预实验？

预实验方法：

- ① 选择预期结果差异较大的2-3个样本，进行不同浓度的样本稀释，然后按照说明书上的实验操作步骤进行预实验，
- ② 根据预实验的结果（样本稀释之后的结果，计算时先不乘以稀释倍数，也不除以蛋白浓度），再结合试剂盒的检测范围来确定样本的最佳稀释倍数。

预实验的目的：

- ① 确定该试剂盒是否适合客户的样本检测，以免造成试剂盒和样本的浪费（比如低表达处理的样本）；
- ② 确定样本的处理方法及稀释倍数是否合适；
- ③ 帮助客户了解实验过程中可能出现的实验现象或问题，以便于及时作出调整。

案例展示：

酶活检测的预实验：

问题：SOD活性检测试剂盒 E-BC-K020-M，检测小鼠的结肠匀浆上清液，测出来SOD抑制率达到了88%，说明书上写到超过65%后需要稀释，可是增加稀释倍数之后抑制率还是较大。

	对照孔	$\Delta A1/A2$	抑制率
对照空白孔	0.034		
对照孔	0.398	0.364	
样本稀释 2 倍	0.071	0.037	89.80%
样本稀释 4 倍	0.07	0.036	90.10%
样本稀释 8 倍	0.081	0.047	87.10%

原因：分析数据，样本的OD值较低，说明样本中SOD酶活较高，所以稀释倍数太小了。

方案：建议将样本稀释20倍、40倍。

结果：样本稀释20倍，抑制率在25-65%之间，样本稀释40倍，抑制率低于25%，所以该样本的最佳稀释倍数为20倍。

	对照孔	$\Delta A1/A2$	抑制率
对照空白孔	0.047		
对照孔	0.516	0.469	
样本稀释 20 倍	0.235	0.188	48.4%
样本稀释 40 倍	0.399	0.352	3.3%

▶ 样本为什么不显色，OD值很小？

- 1) 样本该指标含量太低，可增加样本浓度
- 2) 前处理不当：例如测定酶活，使用了导致酶失活的化学试剂等。
- 3) 样本保存不当或提取方法不当等。
- 4) 试剂保存不当，包括保存温度、放置太久过期了等，导致试剂盒中某些试剂失效。

案例展示：

问题：细胞亚铁检测试剂盒 E-BC-K881-M，检测细胞样本，样本测定OD值较低，亚铁含量计算结果低于灵敏度。

测定 OD 值	对照 OD 值	ΔA	Fe ²⁺ 含量 (nmol/10 ⁶)
0.043	0.037	0.006	0.0400
0.044	0.038	0.006	0.0371
0.050	0.044	0.006	0.0371
0.045	0.038	0.007	0.0571
0.046	0.039	0.007	0.0686

原因：客户实验中使用了1*10⁶细胞加入了0.2 mL试剂一进行裂解，根据实验结果判断，客户细胞样本中的亚铁含量较低，用于检测的细胞浓度不够。

方案：建议使用2*10⁶细胞加入了0.2mL试剂一进行裂解。

结果：客户增加稀释细胞量之后检测，得到满意的结果。

测定 OD 值	对照 OD 值	ΔA	Fe ²⁺ 含量 (nmol/10 ⁶)
0.056	0.041	0.015	0.1471
0.057	0.040	0.017	0.1771
0.052	0.040	0.012	0.1071
0.060	0.040	0.020	0.2200
0.054	0.042	0.012	0.1057

▶ 紫外-可见分光光度计，酶标仪和荧光酶标仪检测有什么区别？

代谢测定试剂盒适用于紫外分光光度计，酶标仪，荧光酶标仪，各自有其优缺点：

检测仪器	优点	不足
紫外-可见分光光度计	价格低廉，全波段，波长范围广	样本使用量大，操作不便
酶标仪	操作简单、方便，适合大批量检测	可供选择的波长少
荧光酶标仪	样本用量小，操作简单，灵敏度高，特异性强	仪器价格高昂



紫外-可见分光光度计



酶标仪



荧光酶标仪

荧光酶标仪属于荧光法测试盒的检测仪器，紫外-可见分光光度计和酶标仪是属于比色法试剂盒的检测仪器，每一类试剂盒都有规定适用的仪器，建议按照说明书的操作步骤进行操作，不要随意改变检测仪器。例如同一种指标的分光光度计检测与酶标仪检测法试剂盒不能换用，因为两者测定体系不同，检测仪器的灵敏度也不一样。

Q1 组织或者细胞样本必须测蛋白浓度吗，可不可以用其他方式进行计算？

A1 一般测组织或细胞样本时要先进行匀浆处理，匀浆的程度不一样释放的蛋白也不一样，测蛋白就是为了校正匀浆破碎的程度，说明书上标注了测蛋白，是需要测定蛋白的，但有些指标的匀浆介质不适用于测蛋白，是可以组织鲜重或细胞数量进行计算。
注：蛋白定量是通过蛋白试剂盒测定的，测蛋白的方法有很多，最常见的是BCA法，一般说明书中会推荐测蛋白方法。

Q1 怎样判断是否做标曲？能否不做标曲，直接采用说明书上的？

A1 判断要不要做标曲，可以看说明书上操作表部分。需要客户做标曲的产品，一般是不建议直接用说明书上的标曲计算样本值，因为实验室的环境、仪器设备、实验人员、操作手法都不一样，因此实际的标曲是跟说明书上会有差异的。

Q1 标准曲线如何制作？

A1

- ① 代谢测定试剂盒中的标准品/标曲，建议做复孔，并计算每个浓度标准品的平均OD值；
- ② 将不同浓度标准品的平均OD值减去空白孔的平均OD值，得到绝对OD值；
- ③ 以不同浓度标准品为X轴，绝对OD值为Y轴，利用作图软件得到合适的拟合曲线并计算样本浓度。

注：推荐使用Excel/Origin软件作图，并进行拟合，得到标准曲线。

▶ 客户发表的部分文献

指标	文献	IF
LA	Meng J J, Shen J W, Li G, et al. Light modulates glucose metabolism by a retina-hypothalamus-brown adipose tissue axis[J]. Cell, 2023, 186(2): 398-412.	66.85
FFA	Wang X, He Q, Zhou C, et al. Prolonged hypernutrition impairs TREM2-dependent efferocytosis to license chronic liver inflammation and NASH development. Immunity. 2023	43.473
L-LA	Mu X, Xiang Z, Xu Y, et al. Glucose metabolism controls human $\gamma\delta$ T-cell-mediated tumor immunosurveillance in diabetes[J]. Cellular & Molecular Immunology.	22.096
K+	[1] Zeng B, Huang Y, Chen S, et al. Dextran sodium sulfate potentiates NLRP3 inflammasome activation by modulating the KCa3.1 potassium channel in a mouse model of colitis[J]. Cellular & Molecular Immunology.	22.096
NEFA	Peng H, Chen B, Wei W, et al. N6-methyladenosine (m6A) in 18S rRNA promotes fatty acid metabolism and oncogenic transformation[J]. Nature Metabolism, 2022, 4(8): 1041-1054.	19.865
PA	Tseng S J, Kempson I M, et al. An acid degradable, lactate oxidizing nanoparticle formulation for non-small cell lung cancer virotherapy[J]. Nano Today, 2022,	18.962
H ₂ O ₂	Du S, Zhou N, Xie G, et al. Surface-Engineered Triboelectric Nano generator Patches with Drug Loading and Electrical Stimulation Capabilities: Toward Promoting Infected Wounds Healing[J]. Nano Energy, 2021,	17.087
NEFA	Ge C, Tan J, Dai X, et al. Hepatocyte phosphatase DUSP22 mitigates NASH-HCC progression by targeting FAK[J]. Nature communications, 2022,	17.694
GSH/GSSG	Li X, Wu T, Zhang Z, et al. Tumor microenvironment activated nanoreactors for chemiluminescence imaging-guided simultaneous elimination of breast tumors and tumor-resident intracellular pathogens[J]. Chemical Engineering Journal, 2023,	16.744

更多指标发表文献信息及应用可访问官网进行查询或咨询技术支持

铁死亡 (Ferroptosis) 简要通路图

