

Amplex Red磷酸烯醇式丙酮酸检测试剂盒

产品编号	产品名称	包装
S0311S	Amplex Red磷酸烯醇式丙酮酸检测试剂盒	100次

产品简介:

- 碧云天研发的Amplex Red磷酸烯醇式丙酮酸检测试剂盒(Amplex Red Phosphoenolpyruvate Assay Kit, 简称Amplex Red PEP Assay Kit)是一种基于探针Amplex Red, 利用荧光或吸光度检测, 快速、高灵敏地对血清、血浆、尿液等生物体液、组织、细胞以及组织或细胞培养上清样品中磷酸烯醇式丙酮酸与磷酸烯醇式丙酮酸盐含量进行检测的试剂盒。通常0.5-5 μ l血清或血浆样品就足够用于本试剂盒的荧光法检测。
- 磷酸烯醇式丙酮酸(Phosphoenolpyruvate, PEP)是生物细胞中常见的生化分子, 是糖酵解及糖原异生中碳水化合物代谢的一种关键中间产物, 是生命活动中非常重要的一种化学物质, 参与多种生物化学过程。无论在动物界还是植物界、在细胞呼吸还是在光合作用中, PEP都发挥着重要作用。PEP作为重要代谢中间产物, 参与糖酵解的最后一步反应, 即磷酸烯醇式丙酮酸由丙酮酸激酶(Pyruvate kinase)的催化, 使连接在氧原子上的磷酸根转移到ADP上, 进而生成ATP以及丙酮酸, 并释放出大量的能量。在C4植物中, PEP在磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(PEP羧化酶)的作用下固定CO₂, 并转化为草酰乙酸[1]。
- 本试剂盒中的Amplex Red是一种对H₂O₂高度敏感的荧光探针。在辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)存在的条件下, Amplex Red能与H₂O₂ 1:1反应, 产生强烈的红色荧光物质试卤灵(Resorufin)。试卤灵的最大激发波长为571nm, 最大发射波长为585nm, 并且在激发波长处有很强的可见光吸收。因此本试剂盒可以用吸光度和荧光两种方法来进行检测。
- 本试剂盒的检测原理请参考图1。在丙酮酸激酶(Pyruvate kinase, PK)的催化作用下, 磷酸烯醇式丙酮酸(Phosphoenolpyruvate, PEP)与二磷酸腺苷(Adenosine diphosphate, ADP)反应产生丙酮酸(Pyruvic acid)和ATP。在黄素腺嘌呤二核苷酸(Flavin adenine dinucleotide, FAD)、硫胺素焦磷酸(Thiamine pyrophosphate, TPP)和镁离子存在的条件下, 生成的丙酮酸进一步在丙酮酸氧化酶(Pyruvate oxidase, PO)的作用下和氧气发生氧化反应生成乙酰磷酸(Acetyl phosphate)、CO₂和H₂O₂, 再通过检测H₂O₂与Amplex Red的反应产物试卤灵(Resorufin)的荧光强度或吸光度来最终计算样品中磷酸烯醇式丙酮酸的含量。试卤灵的荧光强度或吸光度与样品中磷酸烯醇式丙酮酸的含量成正比。

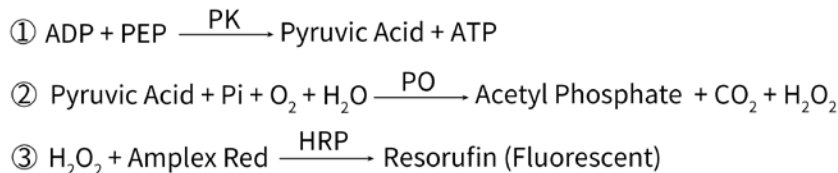


图1. 碧云天Amplex Red磷酸烯醇式丙酮酸检测试剂盒(S0311)检测原理图。

- 本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽, 样品用量少。本试剂盒在样品体积为20 μ l时, 采用吸光度检测可以检测浓度低至10 μ M的磷酸烯醇式丙酮酸, 在10-500 μ M浓度范围内有良好的线性关系; 采用荧光检测可以检测浓度低至1 μ M的磷酸烯醇式丙酮酸, 在1-200 μ M浓度范围内有良好的线性关系。荧光检测的灵敏度比吸光度检测高约10倍, 可以使用更少量的样品。本试剂盒提供了磷酸烯醇式丙酮酸标准溶液, 可以通过绘制标准曲线(图2), 计算出样品中的磷酸烯醇式丙酮酸含量。

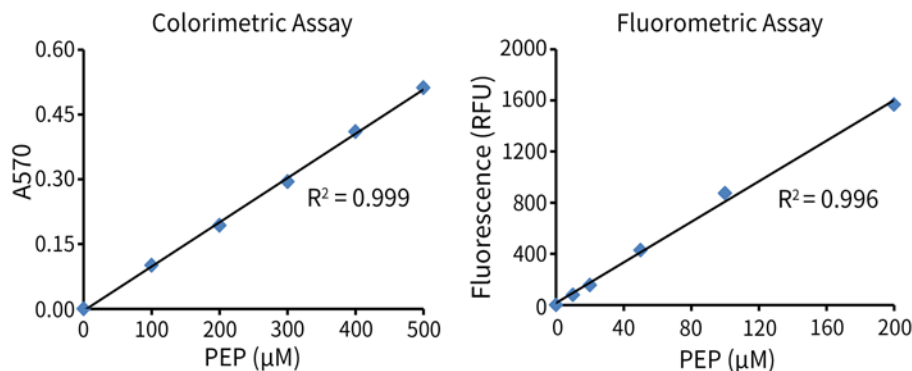


图2. 碧云天Amplex Red磷酸烯醇式丙酮酸检测试剂盒(S0311)检测磷酸烯醇式丙酮酸标准品的标准曲线。左图为吸光度检测, 右图为荧光检测。本试剂盒采用吸光度检测时, 在10-500 μ M浓度范围内有良好的线性关系; 采用荧光检测时, 在1-200 μ M浓度范围内有良好的线性关系。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- **本试剂盒检测方法灵活，检测速度快。**本试剂盒既可以进行荧光检测，也可进行吸光度检测。整个检测过程约30分钟即可完成。
- **本试剂盒提供的检测裂解液有一定的通用性。**使用本试剂盒中的BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay裂解获得的细胞或组织样品，也可以用于碧云天生产的其它代谢类试剂盒中同样使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay进行裂解的样品检测，通用性强；而且还可用于检测蛋白浓度、进行SDS-PAGE或一些较易溶解蛋白的Western检测。
- **本试剂盒应用范围广。**本试剂盒可用于小鼠、大鼠、人等的血清、血浆、尿液等生物体液，细胞培养上清、组织或细胞样品等的检测。本试剂盒不仅适合少量样品的检测，也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统。
- 按照使用说明操作，用于96孔板检测时，本试剂盒小包装可以进行100次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
S0311S-1	BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay	20ml
S0311S-2	PEP Assay Buffer	20ml
S0311S-3	Amplex Red	200μl
S0311S-4	Enzyme Solution A	200μl
S0311S-5	Enzyme Solution B	200μl
S0311S-6	Cofactor	200μl
S0311S-7	PEP Standard (10mM)	200μl
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，一年有效。其中Amplex Red和Cofactor须避光保存。

注意事项：

- Amplex Red在空气中不太稳定，开启后应尽快使用，且在使用过程中需注意适当避光。
- Amplex Red的反应产物在还原剂的存在下会很不稳定，因此最终反应体系中的二硫苏糖醇(DTT)、β-巯基乙醇或类似还原剂的浓度应低于10μM。
- 请确保反应体系的pH值在7-8之间，否则会影响Amplex Red的稳定性和荧光值。
- Amplex Red和PEP Assay Buffer需要完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。其它各种溶液使用时应在冰上进行。
- 为减少稀释液产生的荧光背景带来的误差，样品和标准品的稀释液应该根据样品的种类来定。当样品为BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay制备的细胞或组织的裂解样品时，应使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay稀释，当样品为血液等其它样品时，宜使用PEP Assay Buffer稀释。
- 血清、血浆等样品如果在4°C保存，保存的时间不得超过2周，否则会影响检测结果的准确性。通常血清样品宜在-20°C保存，-80°C保存更佳。
- 荧光酶标仪检测时须使用适合荧光检测的黑板或白板，推荐使用碧云天BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(平底带盖，独立包装)(FCP966)或BeyoGold™黑色透明底96孔细胞培养板(平底带盖，独立包装)(FCP965)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 样品的准备：

- 血液样品的准备：对于血清样品，将全血在常温如25°C下放置30分钟-2小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4°C约1000-2000×g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀；对于血浆样品，将全血用肝素或者EDTA进行抗凝，4°C约1000-2000×g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。血清和血浆都需置于冰上，如果不能立即检测，也可以分装并短期保存于-20°C或-80°C。对于冻存的样品，在检测前解冻后冰浴存放备用，使用前必须混匀。
- 细胞或组织样品的准备：对于培养的贴壁细胞，PBS (C0221A)洗涤一次并吸净残留液体。对于培养的悬浮细胞，先适当离心(如100-500×g，5分钟)收集细胞到离心管内，弃上清并吸净残留液体。按照每100万细胞加入100-200μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例加入裂解液，适当吹打，冰浴5-10分钟以充分裂解细胞。4°C约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。对于组织样品，按照每10mg组织加入100μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例，使用TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48)(E6618)、TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600)或玻璃匀浆器在约4°C或冰浴等低温条件下进行匀浆。4°C约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。以上所有操作均需在4°C或冰上操作。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测，可以-20°C或-80°C冻存。
- 细胞培养上清样品的准备：对于贴壁细胞，直接取培养液；对于悬浮细胞，离心取培养液。

2. 试剂盒的准备：

- 融解Amplex Red和PEP Assay Buffer，平衡至室温后混匀备用。其它试剂存放于冰浴备用，使用完毕后宜立即按照试剂盒要求的条件保存。

- b. Amplex Red反应工作液(Working Solution)的配制: 按照每个反应80μl的体积配制适量的Amplex Red反应工作液。均匀混合72μl PEP Assay Buffer、2μl Amplex Red、2μl Enzyme Solution A、2μl Enzyme Solution B、2μl Cofactor, 即可配制成80μl Amplex Red反应工作液。根据待检测样品(包括标准品)的数量, 配制适量的Amplex Red反应工作液。具体配制方法参考下表。配制好的Amplex Red反应工作液如果置于4°C或冰浴避光保存, 可以在当天使用, 但建议尽量现配现用。

Samples	1	10	20	50
PEP Assay Buffer (μl)	72	720	1440	3600
Amplex Red (μl)	2	20	40	100
Enzyme Solution A (μl)	2	20	40	100
Enzyme Solution B (μl)	2	20	40	100
Cofactor (μl)	2	20	40	100
Working Solution (μl)	80	800	1600	4000

注1: 由于酶溶液的用量较少且易沉降, 必须注意在使用前先轻轻离心一下, 然后适当混匀后再使用。

注2: 丙酮酸和H₂O₂的存在会对磷酸烯醇式丙酮酸的检测产生干扰。如果样品含有丙酮酸或者H₂O₂, 须同时设置背景对照孔, 加入不含Enzyme Solution A的Amplex Red反应工作液, 即配制Amplex Red反应工作液时2μl Enzyme Solution A用PEP Assay Buffer替代。计算时样品孔的读数需要减去对照孔的读数。

3. 样品测定:

- a. PEP标准曲线设置(吸光度或荧光检测, 可选取其中的一种, 对于样品量较少或浓度较低的情况, 优先推荐采用荧光检测)。
- (a) 吸光度检测: 取5μl PEP Standard (10mM), 加入95μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay或者PEP Assay Buffer (如果检测BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay制备的细胞或组织样品, 可以使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay; 如果检测血液、上清等无需处理的样品, 可以使用PEP Assay Buffer), 混匀, 配制成浓度为500 μM的PEP标准溶液。分别取500 μM的PEP标准溶液0、4、8、12、16、20 μl加入96孔板的标准品孔中, 并相应地用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay或PEP Assay Buffer补足至20 μl, 此时, 标准曲线的浓度分别为0、100、200、300、400、500 μM。
- 注: 吸光度检测时建议使用透明96孔板(FPT010/FPT011/FCP962)。
- (b) 荧光检测: 取2 μl PEP Standard (10mM), 加入98 μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay或者PEP Assay Buffer (如果检测BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay制备的细胞或组织样品, 可以使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay; 如果检测血液、上清等无需处理的样品, 可以使用PEP Assay Buffer)混匀, 配制成浓度为200 μM的PEP标准溶液。分别取200 μM的PEP标准溶液0、1、2、5、10、20 μl加入96孔板的标准品孔中, 并相应地用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay或PEP Assay Buffer补足至20 μl, 此时, 标准曲线的浓度分别为0、10、20、50、100、200 μM。
- 注: 荧光检测时建议使用96孔黑板(FCP965/FCP966)。
- b. 取1-20 μl样品或稀释后的样品至96孔板样品孔中, 并相应地加入BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay或PEP Assay Buffer至样品孔中, 补足至20 μl。同时设置仅含BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay或PEP Assay Buffer的孔为空白对照。
- 注: 为确保样品数值在标准曲线范围内, 建议进行预实验将样品设置多个稀释倍数, 以确定样品中ADP的大致浓度, 如果数值不在标准曲线范围内, 请调整样品的稀释倍数或者样品的量。如果检测BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay制备的细胞或组织裂解样品, 请使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay稀释; 如果检测血液、上清等无需裂解处理的样品, 可以使用PEP Assay Buffer稀释。样品总稀释倍数记为n (例如本步骤中对样品进行了10倍稀释, 加入的‘稀释后的样品’为10 μl, 则n=10×20/10=20)。
- c. 各孔加入Amplex Red反应工作液80 μl, 混匀, 37°C避光反应30分钟。
- 注: 如果吸光度偏低或荧光偏弱, 可适当延长反应时间, 例如反应45或60分钟。
- d. 如果使用吸光度检测, 测定A570; 如果使用荧光检测, 设置激发波长为560nm, 发射波长为590nm进行荧光强度检测。
- e. 建立标准曲线, 并计算样品中PEP的浓度(A), 如果样品的背景对照信号比较高, 样品的信号值应减去样品背景对照的信号值。PEP标准曲线可以参考图2, 吸光度检测在10-500 μM浓度范围内有良好的线性关系, 荧光检测在1-200 μM浓度范围内有良好的线性关系。PEP浓度的计算公式如下:

$$C (\mu\text{M}) = A \times n$$

注1: A为步骤3e根据标准曲线确定的PEP浓度(μM);

n为步骤3b样品总稀释倍数。

注2: 计算获得的磷酸烯醇式丙酮酸浓度其中包含了磷酸烯醇式丙酮酸和磷酸烯醇式丙酮酸根的摩尔浓度, 也可以理解为包含了磷酸烯醇式丙酮酸和磷酸烯醇式丙酮酸盐的摩尔浓度。上述仅为了表述方便, 仅描述为磷酸烯醇式丙酮酸。

参考文献:

1. Wilson DF, Erecińska M, Schramm VL. J Biol Chem. 1983. 258(17):10464-73.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C0016/C0017	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒	100次/500次

C0018S/M	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次
S0110S	黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0111S	黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒(WST-8法)	100次
S0112S/M	Amplex Red黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒	100次/500次
S0113S	Amplex Red黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒	100次
S0114S	黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0204S	D-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0208S	L-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0211S/M	Amplex Red胆固醇与胆固醇酯检测试剂盒	100次/500次
S0215S/M	Amplex Red游离脂肪酸检测试剂盒	100次/500次
S0219S/M	Amplex Red甘油三酯检测试剂盒	100次/500次
S0223S/M	Amplex Red甘油检测试剂盒	100次/500次
S0227S	Amplex Red L-乳酸检测试剂盒	100次
S0231S	Amplex Red尿酸与尿酸酶检测试剂盒	100次
S0235S	Amplex Red磷酸盐检测试剂盒	100次
S0239S	Amplex Red乙醇检测试剂盒	100次
S0243S/M	Amplex Red黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒	100次/500次
S0247S	Amplex Red谷氨酸与谷氨酸氧化酶检测试剂盒	100次
S0251S	Amplex Red过氧化氢与过氧化物酶检测试剂盒	100次
S0255S	Amplex Red过氧化氢酶检测试剂盒	100次
S0259S	Amplex Red单胺氧化酶检测试剂盒	100次
S0263S	Amplex Red鞘磷脂酶检测试剂盒	100次
S0267S	Amplex Red胆碱与乙酰胆碱检测试剂盒	100次
S0271S	Amplex Red乙酰胆碱酯酶检测试剂盒	100次
S0275S	Amplex Red磷脂酰胆碱检测试剂盒	100次
S0279S	Amplex Red磷脂酶D检测试剂盒	100次
S0283S	Amplex Red肌酸检测试剂盒	100次
S0287S	Amplex Red肌酸激酶检测试剂盒	100次
S0291S	Amplex Red肌酐检测试剂盒	100次
S0295S	Amplex Red肌氨酸检测试剂盒	100次
S0299S	Amplex Red丙酮酸检测试剂盒	100次
S0303S	Amplex Red丙酮酸激酶检测试剂盒	100次
S0307S	Amplex Red ADP检测试剂盒	100次
S0311S	Amplex Red磷酸烯醇式丙酮酸检测试剂盒	100次
S0315S	Amplex Red丙氨酸检测试剂盒	100次
S0319S	Amplex Red丙氨酸转氨酶检测试剂盒	100次
S0323S	Amplex Red α -酮戊二酸检测试剂盒	100次
S0327S	Amplex Red天冬氨酸检测试剂盒	100次
S0331S	Amplex Red天冬氨酸氨基转移酶检测试剂盒	100次
S0335S	Amplex Red柠檬酸检测试剂盒	100次
S0339S	Amplex Red草酰乙酸检测试剂盒	100次
S0343S	Amplex Red葡萄糖检测试剂盒	100次
S0347S	Amplex Red葡萄糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0351S	Amplex Red果糖检测试剂盒	100次
S0355S	Amplex Red乳糖检测试剂盒	100次
S0359S	Amplex Red半乳糖与乳糖检测试剂盒	100次
S0363S	Amplex Red半乳糖与半乳糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0367S	Amplex Red麦芽糖检测试剂盒	100次
S0371S	Amplex Red麦芽糖与葡萄糖检测试剂盒	100次
S0375S	Amplex Red糖原检测试剂盒	100次
S0379S	Amplex Red磷酸果糖激酶检测试剂盒	100次
S0383S	Amplex Red乙酰辅酶A检测试剂盒	100次

S0387S	Amplex Red辅酶A检测试剂盒	100次
S0391S	Amplex Red乙酰辅酶A合成酶检测试剂盒	100次
S0511S	L-苹果酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0514S	苹果酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0517S	延胡索酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0520S	延胡索酸酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0523S	异柠檬酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0526S	异柠檬酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0529S	Amplex Red琥珀酸检测试剂盒	100次
S0530S	琥珀酸脱氢酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0532S	Amplex Red琥珀酰辅酶A合成酶检测试剂盒	100次
S0535S	支链氨基酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0538S	N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0540S	酪氨酸检测试剂盒(显色法)	100次
S0542S	酪氨酸酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0545S	酪氨酸酶抑制剂筛选试剂盒(显色法)	100次
S0547S	髓过氧化物酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0548S	Amplex Red髓过氧化物酶活性检测试剂盒	100次
S0550S	Amplex Red髓过氧化物酶抑制剂筛选试剂盒	100次

Version 2024.09.06