

Amplex Red磷酸盐检测试剂盒

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|--------|--------------------|------|
| S0235S | Amplex Red磷酸盐检测试剂盒 | 100次 |

产品简介:

- 碧云天研发的Amplex Red磷酸盐检测试剂盒(Amplex Red Phosphate 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盐含量进行检测的试剂盒。通常0.5-50 μ l血清或血浆样品就足够用于本试剂盒的荧光法检测。
- 磷酸盐(Phosphate)是由磷酸基团和金属离子组成的磷化合物, 在无机化学、生物化学及生物地质化学上都是很重要的物质。磷酸盐作为天然成分常见于几乎所有食物中, 也以钠盐、钙盐、钾盐、铁盐和锌盐等形式作为食品配料或添加剂而广泛用于食品加工, 磷酸钠盐通常被认为是最主要的食品用磷酸盐。在生物体内, 磷酸盐可以由焦磷酸盐(P₂i)水解生成, 在溶液中以游离离子形式存在, 故又称为‘无机磷酸盐’; 磷酸盐还以一磷酸腺苷(AMP)、二磷酸腺苷(ADP)、三磷酸腺苷(ATP)、脱氧核糖核酸(DNA)及核糖核酸(RNA)的形式在机体内广泛存在。ADP、ATP和其它二磷酸及三磷酸核苷中的磷酸酐键水解断裂后, 会释放大量能量, 参与机体内的生物氧化, 并且产生磷酸离子[1,2]。
- 磷酸盐作为生物系统中最重要的无机盐之一, 有着广泛的生化功能, 参与多种生物学功能的实现, 如核酸、细胞膜和骨的结构形成, 在细胞内能量运输、核酸代谢及信号转导中同样有着非常重要的作用。磷酸盐最重要的功能之一是充当分子开关, 介导生物系统中各种蛋白激酶和蛋白磷酸酶调控的磷酸化修饰蛋白活性的开启和关闭。在肾功能衰竭排磷困难、甲状旁腺功能减退、细胞损坏后磷转移入血、维生素D过量和摄入过多等情况下会引起血液磷酸盐含量的升高而引发高磷血症, 进而导致器官的钙化并影响对铁、钙和锌离子等其它无机离子的利用[3]。因此, 磷酸盐含量的检测具有重要的意义。
- 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)存在的情况下, 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如图1所示。在麦芽糖磷酸化酶(Maltose phosphorylase, MP)的催化作用下磷酸盐与麦芽糖(Maltose)反应产生葡萄糖-1-磷酸(Glucose-1-phosphate)和葡萄糖(Glucose), 生成的葡萄糖进一步在葡萄糖氧化酶(Glucose oxidase, GOD)的作用下和氧气发生氧化反应生成D-葡萄糖醛酮(D-glucosone)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盐的含量。试卤灵的荧光强度或吸光度与样品中磷酸盐的含量成正比。

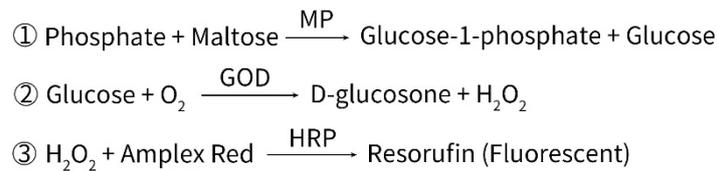


图1. 碧云天Amplex Red磷酸盐检测试剂盒(S0235)检测原理图。

- 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5 μ M的磷酸盐, 在5-200 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0.5 μ M的磷酸盐, 在0.5-50 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盐标准溶液, 可以通过绘制标准曲线(图2), 计算出样品中的磷酸盐含量。

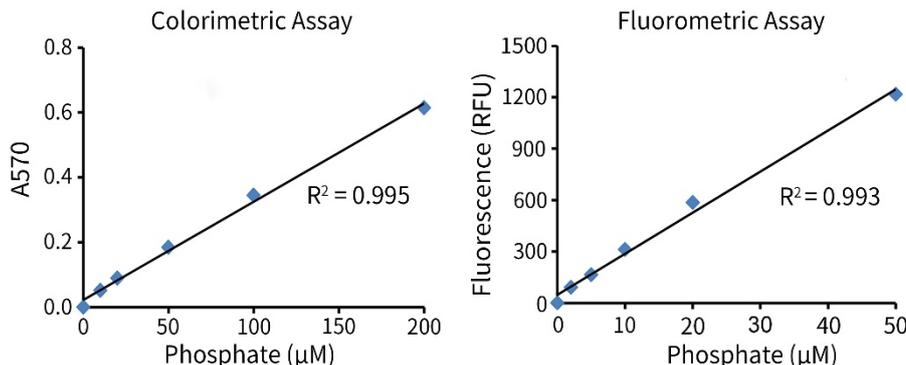


图2. 碧云天Amplex Red磷酸盐检测试剂盒(S0235)检测磷酸盐标准品的标准曲线。左图为吸光度检测, 右图为荧光检测。本试剂盒采用吸光度检测时, 在5-200 μ M浓度范围内有良好的线性关系; 采用荧光检测时, 在0.5-50 μ M浓度范围内有良好的线性关系。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- **本试剂盒检测方法灵活, 检测速度快。**相较于Malachite Green Phosphate Detection Kit (S0196), 本试剂盒的检测灵敏度更高、检测方法更加灵活。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。**本试剂盒可以用于检测各种样品中ATP酶、GTP酶、5'核苷酸酶、蛋白磷酸酶、酸碱性磷酸酶以及磷酸化酶参与的反应中产生的磷酸盐。同时可以通过设置葡萄糖对照实验来消除葡萄糖的背景影响。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本的检测, 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 |
|----------|---|-------------|
| S0235S-1 | BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay | 20ml |
| S0235S-2 | Phosphate Assay Buffer | 20ml |
| S0235S-3 | Amplex Red | 200 μ l |
| S0235S-4 | Enzyme Solution A | 200 μ l |
| S0235S-5 | Enzyme Solution B | 200 μ l |
| S0235S-6 | Phosphate Substrate | 200 μ l |
| S0235S-7 | Phosphate Standard (100mM) | 200 μ l |
| — | 说明书 | 1份 |

保存条件:

-20°C保存, 一年有效。其中Amplex Red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10 μ M。
- 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Phosphate 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。
- 样品中的葡萄糖会对磷酸盐的检测产生干扰。因此, 对于同时含有葡萄糖的样品, 须设置葡萄糖对照实验以消除干扰。
- 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Phosphate 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 \times 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 \times 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 \times 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100-200 μ l 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 \times 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100 μ l 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。

c. 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:

a. 融解Amplex Red和Phosphate 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 Phosphate Assay Buffer、2μl Amplex Red、2μl Enzyme Solution A、2μl Enzyme Solution B、2μl Phosphate Substrate, 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 |
|------------------------------|-----------|------------|-------------|-------------|
| Phosphate 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 |
| Phosphate Substrate (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: 葡萄糖及H₂O₂的存在会对磷酸盐的检测产生干扰。如果样品含有葡萄糖或者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Phosphate Assay Buffer替代。

3. 样品测定:

a. 磷酸盐标准曲线设置(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10μl Phosphate Standard (100mM), 加入490μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay或者Phosphate 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Phosphate Assay Buffer), 混匀, 配制成浓度为2mM的磷酸盐标准溶液。再取2mM的磷酸盐标准溶液20μl, 加入180μl Phosphate Assay Buffer, 混匀, 配制成浓度为200μM的磷酸盐标准溶液。分别取200μM的磷酸盐标准溶液0、1、2、5、10、20μl加入96孔板的标准品孔中, 并相应地用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay或Phosphate Assay Buffer补足至20μl, 此时, 标准曲线的浓度分别为0、10、20、50、100、200μM。

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10μl Phosphate Standard (100mM), 加入490μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay或者Phosphate 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Phosphate Assay Buffer)混匀, 配制成浓度为2mM的磷酸盐标准溶液。再取2mM的磷酸盐标准溶液5μl, 加入195μl Phosphate Assay Buffer, 混匀, 配制成浓度为50μM的磷酸盐标准溶液。分别取50μM的磷酸盐标准溶液0、0.8、2、4、8、20μl加入96孔板的标准品孔中, 并相应地用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay或Phosphate Assay Buffer补足至20μl, 此时, 标准曲线的浓度分别为0、2、5、10、20、50μM。

注: 荧光检测时建议使用96孔黑板(FCP965/FCP966)。

b. 取1-20μl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Phosphate Assay Buffer至样品孔中, 补足至20μl。同时设置仅含BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay或Phosphate 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, 以确定样品中磷酸盐的大致浓度, 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Phosphate 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10μl, 则n=10×20/10=20)。

c. 各孔加入Amplex Red反应工作液80μl, 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, 并计算样品中磷酸盐的浓度(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。磷酸盐标准曲线可以参考图2, 吸光度检测在5-200μM浓度范围内有良好的线性关系, 荧光检测在0.5-50μM浓度范围内有良好的线性关系。磷酸盐浓度的计算公式如下:

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

注：A为步骤3e根据标准曲线确定的磷酸盐浓度(μM)；
n为步骤3b样品总稀释倍数。

参考文献：

1. Nicolaidis S. Physiol Behav. 2011. 104(1):8-14.
2. Wilson DF, Matschinsky FM. Int J Mol Sci. 2022. 23(10):5550.
3. Rubio-Aliaga I, Krapf R. Pflugers Arch. 2022. 474(8):935-947.

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 2024.08.02