

同型半胱氨酸（HCY）（酶循环法）检测试剂盒说明书

（货号：ADS-W-D013 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
试剂一	液体 16mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂二	液体 4.5mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准管	液体 0.2mL×1 支	4℃避光保存	浓度见标签

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以免造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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。

③ 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 生理盐水，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 常温离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min（等待仪器过自检程序亦可），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：

试剂组分（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 μ L 增至 20 μ L, 空白管也由 10 μ L 增至 20 μ L 蒸馏水, 标准管是 10 μ L 标准品和 10 μ L 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:

$$\begin{aligned} \text{同型半胱氨酸(HCY)}(\text{nmol/g}) &= (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} / T - \Delta A_{\text{空白}} / T) \div (\Delta A_{\text{标准}} / T - \Delta A_{\text{空}} / T) \div (V_1 \div V \times W) \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} / T - \Delta A_{\text{空白}} / T) \div (\Delta A_{\text{标准}} / T - \Delta A_{\text{空}} / T) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按照蛋白浓度计算:

$$\begin{aligned} \text{同型半胱氨酸(HCY)}(\text{nmol/mg prot}) &= (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} / T - \Delta A_{\text{空白}} / T) \div (\Delta A_{\text{标准}} / T - \Delta A_{\text{空}} / T) \div (V_1 \div V \times C_{\text{pr}}) \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} / T - \Delta A_{\text{空白}} / T) \div (\Delta A_{\text{标准}} / T - \Delta A_{\text{空}} / T) \div C_{\text{pr}} \times D \end{aligned}$$

3、按照体积计算:

$$\begin{aligned} \text{同型半胱氨酸(HCY)}(\mu\text{mol/L}) &= (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} / T - \Delta A_{\text{空白}} / T) \div (\Delta A_{\text{标准}} / T - \Delta A_{\text{空}} / T) \div V_1 \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} / T - \Delta A_{\text{空白}} / T) \div (\Delta A_{\text{标准}} / T - \Delta A_{\text{空}} / T) \times D \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned} \text{同型半胱氨酸(HCY)}(\text{nmol}/10^4\text{cell}) &= (C_{\text{标准}} \times V_2) \times (\Delta A_{\text{测定}} / T - \Delta A_{\text{空白}} / T) \div (\Delta A_{\text{标准}} / T - \Delta A_{\text{空}} / T) \div (V_1 \div V \times 500) \times D \\ &= C_{\text{标准}} \times (\Delta A_{\text{测定}} / T - \Delta A_{\text{空白}} / T) \div (\Delta A_{\text{标准}} / T - \Delta A_{\text{空}} / T) \div 500 \times D \end{aligned}$$

C 标准---标品浓度, 见标签;

$\Delta A/T$ ---每分钟吸光度变化率;

V1---加入样本体积, 0.01mL;

V2---加入标准品体积, 0.01mL;

V---提取液体积, 1mL;

W---质量, g;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1。

500---细胞数量, 万;

Cpr---上清液蛋白浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒