

Fluorimetric Pyrophosphate Assay Kit 焦磷酸(PPi)荧光检测试剂盒

产品信息

产品名称	产品编号	规格
Fluorimetric Pyrophosphate Assay Kit 焦磷酸(PPi)荧光检测试剂盒	50115ES70	200 T

产品描述

许多生化反应,例如 ATP 水解、DNA 和 RNA 聚合、腺苷酸环化酶形成的环 AMP 和脂肪酸的酶促活化以形成它们的辅酶 A 酯,都能产生焦磷酸盐(PPi),PPi 能被无机焦磷酸酶水解。翌圣焦磷酸(PPi)荧光检测试剂盒采用最可靠的焦磷酸盐分光光度测定方法,使用专有的荧光 PPi 感受器(Ex/Em=316/456 nm)测定样本 PPi 的含量,相对于传统的酶偶联方法更简单、更稳定,是筛选酶活性或酶抑制剂的理想方法。

该试剂盒已经成功用于高通量筛选,适用于多种样本,如:尿液、血清、血浆、细胞培养提取物、组织裂解物等。

产品组分

组分编号	组分名称	组分规格
50115-A	Assay Buffer	25 mL×1
50115-B	PPi Sensor (Lyophilized)	1 vial
50115-C	Pyrophosphate Standard	1 mL×1, 50 mM
50115-D	DMSO	200 μL×1

运输和保存方法

冰袋运输。-25~-15°C避光保存,有效期2年。

注意事项

1. 荧光染料均存在淬灭问题,请尽量注意避光,以减缓荧光淬灭。
2. 为了您的安全和健康,请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. 粉末溶解前请先短暂离心,以保证产品全在管底。
4. 请勿吸入、吞咽或者直接接触皮肤和眼睛。
5. 本产品仅用于科研用途。

实验过程

1、试剂准备

- ① **200× PPi Sensor 母液**: 将 50 μL DMSO (D 组分) 加入 PPi Sensor (Lyophilized) (B 组分) 中制备 200× PPi Sensor 母液,分装-20°C 避光保存,避免反复冻融。25 μL 200× PPi Sensor 母液足以用于一块 96 孔板。
- ② **PPi 标准液(1 mM)**: 向 10 μL 的 50 mM 焦磷酸盐标准溶液 (C 组分) 加入 490 μL ddH₂O 或 50 mM Hepes 缓冲液(pH 7),得到 1 mM PPi 标准溶液。
- ③ **PPi 标准液(PS7 - PS1)**: 向 50 μL 的 1mM 焦磷酸盐标准溶液加入 450 μL ddH₂O 或 50 mM Hepes 缓冲液(pH 7),得到 100 μM PPi 标准溶液(PS7)。取 100 μM PPi 标准溶液,用 ddH₂O 或 50 mM Hepes 缓冲液(pH 7)进行 1: 3 连续稀释,得到连续稀释的焦磷酸盐标准品(PS6-PS1)。
- ④ **PPi Sensor 工作液**: 25 μL 的 200× PPi Sensor 母液加入 5 mL 的 Assay Buffer (组分 A, 用前恢复至室温),充分混合以制备 PPi 工作液。

【注】: 由于该检测方法对 PPi 具有高灵敏度,因此必须使用不含 PPi 的实验室器具和试剂。DTT ≥ 1 mM 会增加背景, MgCl₂ ≥ 2 mM 会抑制反应。

2、根据表 1 和 2 中提供的布局向黑色 96 孔板中加入 50 μL PPI 标准品(PS)、空白对照品(BL, Assay buffer only)或测试样本(TS)。对于 384 孔板，每孔加入 25 μL 。

【注】：建议尿液样品可考虑稀释 1-10 倍，血清和血浆样品可考虑稀释 2-20 倍后再进行检测，具体稀释倍数根据具体实验情况而定。

Table 1. Layout of Pyrophosphate standards and test samples in a solid black 96-well microplate.

BL	BL	TS	TS
PS1	PS1
PS2	PS2		
PS3	PS3		
PS4	PS4		
PS5	PS5		
PS6	PS6		
PS7	PS7		

PS = Pyrophosphate Standard (PS1 - PS7, 0.13 to 100 μM), BL = Blank Control, TS = Test Sample.

Table 2. Reagent composition for each well.

Well	Volume	Reagent
PS1 - PS7	50 μL	Serial Dilutions (0.13 to 100 μM)
BL	50 μL	Assay Buffer
TS	50 μL	Test sample

3、对于 96 孔板，每孔加入 50 μL PPI Sensor 工作液，总测定体积为 100 μL /孔；对于 384 孔板，每孔加入 25 μL PPI 工作液，总测定体积为 50 μL /孔。

4、混匀后，室温孵育 10-30 min。

5、荧光酶标仪下测量荧光读值，Ex/Em = 316/456 nm (Cutoff = 420 nm)。

数据分析

从空白标准孔获得的读数用作阴性对照。从其他标准的读数中减去该值，以获得基线校正值。然后，绘制标准读数以获得标准曲线和方程。该方程可以用于计算样本中 PPI 含量。

【注】：荧光背景会随时间而增加，因此标准品和测试样本的荧光读值计算前需减去空白孔的荧光强度值。

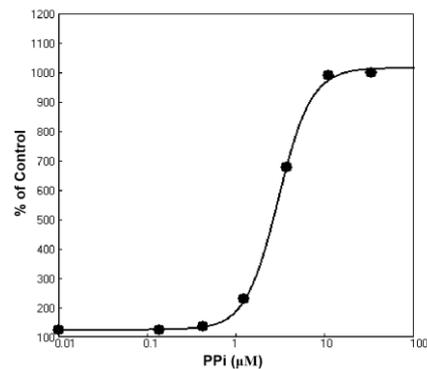


图 1 代表性 PPI 标准曲线