

糖化血清蛋白（GSP）含量检测试剂盒（NBT法）说明书

微量法

货号：AC10765

规格：100T/96S

产品内容：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 5 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	液体 2 mL×1 瓶	-20°C保存
试剂三	液体 30 mL×1 瓶	4°C保存
试剂四	液体 2 mL×1 瓶	4°C保存
标准品	粉剂×1 支	-20°C保存

溶液的配制：

标准品：临用前加入 0.8 mL 试剂二，充分溶解，配制成 10 mmol/L DMF 标准液，4°C保存 4 周；取 20μL 10 mmol/L DMF 标准液和 30μL 试剂二混合配制成 4 mmol/L 标准溶液待测。

产品说明：

血清葡萄糖与白蛋白及其它血清蛋白分子 N 末端的氨基发生非酶促糖化反应，形成高分子酮胺结构，在碱性条件下与硝基四氯唑蓝反应，生成紫红色化合物甲贲。在 530nm 波长处比色，测定其 OD 值，与 DMF 标准比较，即可求得其含量。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、恒温培养箱、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96 孔板、冰和蒸馏水。

操作步骤：**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

血清（浆）：收集血清（浆）到离心管内，按照血清（浆）体积（mL）：试剂一体积（mL）= 10：1 的比例（建议吸取 0.2 mL 血清（浆）于 EP 管中，加入 0.02 mL 试剂一），充分混匀，于 37°C 保温 30 min。

二、测定步骤

1、可见分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 530 nm，蒸馏水调零。

2、标准溶液：按照标准溶液体积（mL）：试剂一体积（mL）= 10：1 的比例（建议吸取 0.2 mL 4 mmol/L 标准溶液于 EP 管中，加入 0.02 mL 试剂一），充分混匀，于 37°C 保温 30 min。

3、按下表步骤加样：

试剂名称 (μL)	测定管	空白管	标准管	标准空白管
样本	10			
蒸馏水		10		
标准溶液			10	
试剂二				10
试剂三	200	200	200	200
37°C显色 15min;				
试剂四	10	10	10	10
充分混匀, 取 200 μL 于微量玻璃比色皿或 96 孔板中, 于 530 nm 处测定吸光度。分别记为 A 测定、A 空白、A 标准、A 标准空白。ΔA 测定=A 测定-A 空白, ΔA 标准=A 标准-A 标准空白。				

注: 空白管和标准空白管均只需做 1-2 次。

三、糖化血清蛋白含量计算

糖化血清蛋白含量 (mmol/L) = $C \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F = 4 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F$

C: 标准溶液浓度, 4 mmol/L; F: 稀释倍数。

注意事项:

1、显色完成后, 应立即加入试剂四; 建议一次性不要做太多样本, 防止试剂四加入不及时导致测定结果受到影响。

2、如果测定吸光值 $A > 1.5$ 或 $\Delta A > 1$, 建议稀释样本后再测定, 计算公式中乘以稀释倍数; 如果测定吸光值较低或接近空白 OD 值, 建议增加操作表中的样本量后再进行测定 (空白管、标准管、标准空白管需要增加至相同体积量)。

实验实例:

1、取 0.2 mL 小鼠血清加入 0.02 mL 试剂一, 充分混匀, 于 37°C 保温 30 min。标准溶液处理同上。按照测定步骤操作, 用 96 孔板测定计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.252 - 0.044 = 0.208$, $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{标准空白}} = 0.227 - 0.101 = 0.126$, 按公式计算小鼠血清中糖化血清蛋白含量:

糖化血清蛋白含量 (mmol/L) = $C \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} = 4 \times 0.208 \div 0.126 = 6.603$ mmol/L。

2、取 0.2 mL 马血清加入 0.02 mL 试剂一, 充分混匀, 于 37°C 保温 30 min。标准溶液处理同上。按照测定步骤操作, 用 96 孔板测定计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.1 - 0.044 = 0.056$, 测定 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{标准空白}} = 0.227 - 0.101 = 0.126$, 按公式计算血清中糖化血清蛋白含量:

糖化血清蛋白含量 (mmol/L) = $C \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} = 4 \times 0.056 \div 0.126 = 1.778$ mmol/L。