

## 组织黑色素含量比色法定量检测试剂盒产品说明书

### 主要用途

组织黑色素含量比色法定量检测试剂是一种旨在通过碱性水解后释放出可溶性黑色素分子，直接由分光光度仪比色分析，定量检测组织样品黑色素含量的权威而经典的技术方法。该技术经过精心研制、成功实验证明的。适用于各种组织（动物、人体等）裂解悬液的黑色素含量检测。产品严格无菌，即到即用，操作简捷，性能稳定，检测准确。

### 技术背景

黑色素（melanin）是一种酪氨酸衍生物复合物，广泛存在于原核生物、动物和植物中。作为一组棕黑色的沉积色素，黑色素不含铁但含硫，不溶于水和有机溶剂，能在强碱中长时间后被溶解，被强氧化剂脱色。黑色素分成两种：优黑素（eumelanin）和褐黑素（pheomelanin）。前者为棕黑色二羟基吲哚（dihydroxyindole）、二羟基吲哚羧酸（dihydroxyindole carboxylic acid）及其还原产物的多聚体；后者为棕红色的苯并噻嗪类（benzothiazine）分子。黑色素与蛋白质结合，形成复合物，通常存在于皮肤、眼睛和大脑黑质（substantia nigra）中。黑色素细胞（melanocytes）产生黑色素，存储在细胞浆的黑色素颗粒中。通过多巴氧化酶（DOPA Oxidase）的作用，使黑色素转化成黑色的多巴黑色素（dopa melanin）。黑色素的显著增加，与黑色素瘤（melanoma）有关。基于含有黑色素的样品在碱性水解后释放出可溶性黑色素分子，直接通过分光光度仪（360nm波长）检测，产生吸光峰值的变化，来测定黑色素的总含量。

### 产品内容

清理液（Reagent A）	毫升
裂解液（Reagent B）	毫升
处理液（Reagent C）	毫升
溶解液（Reagent D）	毫升
缓冲液（Reagent E）	毫升
标准液（Reagent F）	毫升
产品说明书	1份

### 保存方式

保存标准液（Reagent F）在-20℃冰箱里，避免光照；其余的保存在4℃冰箱里，溶解液（Reagent D）、缓冲液（Reagent E）和标准液（Reagent F）具有腐蚀性，严格注意操作安全；有效保证6月

### 用户自备

1.5 毫升离心管：用于标准液配制和样品制备的容器

恒温培养箱或恒温水槽：用于反应孵育

微型台式离心机：用于样品操作

比色皿：用于比色分析的容器

分光光度仪：用于比色分析

## 实验步骤

### 一、样品准备

1. 手术取出动物组织，并称重以确定 500 毫克组织重量
2. （选择步骤）放进预冷的 15 毫升锥形离心管
3. （选择步骤）加入 xx 毫升**清理液（Reagent A）**清洗 1 次
4. 移入到一个液氮冻存管
5. 即刻放进液氮罐过夜
6. 次日从液氮罐里取出，即刻（最快速度）用研磨棒碾碎组织成粉末状（注意：切莫使组织冻融）
7. 放进一个 15 毫升锥形离心管
8. 加入预冷的 xx 微升**裂解液（Reagent B）**
9. 转移到预冷的 1.5 毫升离心管
10. 强力涡旋震荡 30 秒，充分混匀
11. 置于冰槽里孵育 30 分钟
12. 放进 4℃微型台式离心机离心 5 分钟，速度为 16000g（或 13000RPM，例如 eppendorf 5415）
13. 小心移取 500 微升上清液到新的预冷的 1.5 毫升离心管——作为蛋白定量检测之用
14. 移取 10 微升上清液进行蛋白定量检测（注意：建议使用 *Bradford 蛋白质浓度定量试剂盒—HL30030.1*）
15. 加入 xx 微升**处理液（Reagent C）**到组织沉淀颗粒管（注意：无需混匀）
16. 放进 4℃微型台式离心机离心 5 分钟，速度为 16000g（或 13000RPM，例如 eppendorf 5415）
17. 小心抽去上清液
18. 加入 xx 微升**溶解液（Reagent D）**，混匀
19. 即刻放进 -70℃ 保存或置于冰槽里继续后续操作

### 二、标准样品配制

1. 准备好 5 个 1.5 毫升离心管，标记为 1 至 5 号管
2. 分别加入 xx 微升**缓冲液（Reagent E）**到 1 至 5 号管
3. 移取 xx 微升**标准液（Reagent F）**到 1 号管，混匀
4. 小心移取 xx 微升 1 号管稀释的**标准液（Reagent F）**到 2 号管，混匀
5. 小心移取 xx 微升 2 号管稀释的**标准液（Reagent F）**到 3 号管，混匀
6. 小心移取 xx 微升 3 号管稀释的**标准液（Reagent F）**到 4 号管，混匀
7. 将 1 至 5 号管放进冰槽里备用；标准管浓度见下表

管号	缓冲液（Reagent E）	标准液（Reagent F）	测定体系 标准黑色素含量
1	xx 微升	xx 微升	xx 微克
2	xx 微升	xx 微升 1 号管	xx 微克
3	xx 微升	xx 微升 2 号管	xx 微克
4	xx 微升	xx 微升 3 号管	xx 微克
5	xx 微升	0	0

### 三、标准曲线测定

1. 加入 xx 微升**缓冲液 (Reagent E)** 到新的比色皿
2. 加入 xx 微升上述配制的**标准液 (Reagent F)**，混匀
3. 放进 60℃ 恒温水槽孵育 30 分钟，避免光照
4. 即刻放进分光光度仪检测（波长 360nm）：获得吸光读数
5. 重复实验步骤 1 至 4 四次
6. 构建标准曲线：纵坐标（Y 轴）为吸光读数；横坐标（X 轴）为标准黑色素含量（微克）

### 四、样品测定

1. 加入 xx 微升**缓冲液 (Reagent E)** 到新的比色皿
2. 加入 500 微升上述制备的样品，混匀
3. 放进 60℃ 恒温水槽孵育 30 分钟，避免光照
4. 即刻放进分光光度仪检测（波长 360nm）：获得样品吸光读数
5. 根据标准曲线获得样品对应黑色素含量

### 五、含量计算

#### 注意事项

1. 本产品为 25 次操作，包括标准样品
2. 操作时，须戴手套
3. 系统操作时，标准样品测定只需 1 次
4. **溶解液 (Reagent D)**、**缓冲液 (Reagent E)** 和**标准液 (Reagent F)** 具有腐蚀性，严格注意操作安全
5. 孵育时，避免光照
6. 通常黑色素含量表述为：微克/毫克蛋白；微克/毫升；微克/组织重量
7. 本公司提供系列黑色素检测试剂产品

#### 质量标准

1. 本产品经鉴定性能稳定
2. 本产品经鉴定检测敏感