

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: GBQ265

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(390-415 nm)

## Elabscience® 抗氟离子酸性磷酸酶(FRAP)

### 比色法测试盒

## Fluoride Resistant Acid Phosphatase (FRAP)

### Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: [biochemical@elabscience.cn](mailto:biochemical@elabscience.cn)

网址: [www.elabscience.cn](http://www.elabscience.cn)

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测血浆、血清、动物组织、细胞样本中的抗氟离子酸性磷酸酶(FRAP)的活力。

## 检测原理

抗氟离子酸性磷酸酶(FRAP)不被氟离子抑制,催化底物反应生成对硝基苯酚,对硝基苯酚在波长 405 nm 处有最大吸收,通过 405 nm 处的 OD 值大小反映出酶活的大小。

本试剂盒检测组织样本和细胞样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用 BCA 法。(货号: GBQ162)。

## 提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	20 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	氟离子溶液 (Fluoride Ion Solution)	0.5 mL×1 支	-20°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物溶液 (Substrate Solution)	1 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	14 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	10 mmol/L 标准品溶液 (10 mmol/L Standard Solution)	1 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。

## 所需自备物品

**仪器：**酶标仪(390-415 nm，最佳检测波长 405 nm)、37°C 恒温箱

**试剂：**双蒸水、生理盐水(0.9%NaCl)

## 试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液的配制：

将试剂二:双蒸水按体积比=1:79配制，现配现用，按需配制，1 h内使用完。

③ 试剂三工作液的配制：

将试剂三:双蒸水按体积比=1:4配制，现配现用，按需配制，避光待用，1 h内使用完。

④ 0.5 mmol/L标准品溶液的配制：

将试剂五:双蒸水按体积比=1:19配制成0.5 mmol/L标准品，现配现用，按需配制，避光待用，1 h内使用完。

⑤ 测定工作液配制：

将试剂一:试剂三工作液按体积比=3:1配制，现配现用。

⑥ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
<b>标准品浓度(mmol/L)</b>	<b>0</b>	<b>0.1</b>	<b>0.15</b>	<b>0.2</b>	<b>0.3</b>	<b>0.35</b>	<b>0.4</b>	<b>0.5</b>
<b>0.5 mmol/L 标准品(<math>\mu</math>L)</b>	0	40	60	80	120	140	160	200
<b>双蒸水(<math>\mu</math>L)</b>	200	160	140	120	80	60	40	0

## 样本准备

### ① 样本处理

组织样本：按照组织质量(g)：生理盐水(0.9% NaCl)体积(mL)=1：9 匀浆，4°C，10000 × g 离心 10 min，取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本：按照每 $1 \times 10^6$ 个细胞加入200  $\mu$ L生理盐水(0.9% NaCl)的比例匀浆，离心后取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

血清(浆)和尿液等液体样本：直接测定。

### ② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.61-49.37 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肝组织	3-7	人血清	1-3
10%小鼠肾组织	3-7	胎牛血清	1-3
10%小鼠心组织	3-7	$1 \times 10^6$ HL-60 细胞	不稀释
10%小鼠肺组织	3-7	$1 \times 10^6$ 293T 细胞	不稀释
大鼠血浆	5-7		

注：稀释液为生理盐水(0.9%NaCl)。

## 操作步骤

- ① 标准孔：取 20  $\mu\text{L}$  不同浓度的标准品溶液，分别加入相应的酶标孔中。  
测定孔、对照孔：取 20  $\mu\text{L}$  待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向①中加入 20  $\mu\text{L}$  试剂二工作液。
- ③ 向标准孔和待测孔中加入 80  $\mu\text{L}$  测定工作液。  
向对照孔中加入 80  $\mu\text{L}$  试剂一。
- ④ 振板 5 s, 37°C 孵育 10 min。
- ⑤ 向③中加入 100  $\mu\text{L}$  试剂四。
- ⑥ 振板 5 s, 酶标仪 405 nm 波长下检测，测定各孔吸光度。

## 操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度标准品溶液( $\mu\text{L}$ )	20	--	--
待测样本( $\mu\text{L}$ )	--	20	20
试剂二工作液( $\mu\text{L}$ )	20	20	20
试剂一( $\mu\text{L}$ )	--	--	80
测定工作液( $\mu\text{L}$ )	80	80	--
振板 5 s, 37°C 孵育 10 min			
试剂四( $\mu\text{L}$ )	100	100	100
振板 5 s, 酶标仪 405 nm 波长下检测，测定各孔吸光度。			

## 结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

血清（浆）中抗氟离子酸性磷酸酶(FRAP)活力计算公式：

定义：37°C 条件下，每升血清或血浆每分钟催化底物产生 1  $\mu\text{mol}$  的产物所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{FRAP 活力 (U/L)} = (\Delta A_{405} - b) \div a \div T \times f \times 1000$$

组织样本和细胞样本中抗氟离子酸性磷酸酶(FRAP)活力计算公式：

定义：37°C 条件下，每克组织或细胞蛋白每分钟催化底物产生 1  $\mu\text{mol}$  的产物所需要的酶量为一个活力单位。

$$\text{FRAP 活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{405} - b) \div a \div T \times f \div C_{\text{pr}} \times 1000$$

注解：

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

$\Delta A_{405}$ : 样本的绝对 OD 值 ( $\Delta A_{405} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ )

T: 反应时间, 10 min

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

$C_{\text{pr}}$ : 待测样本的蛋白浓度(gprot/L)

1000: 1 mmol/L=1000  $\mu\text{mol/L}$

## 附录1 关键数据

### 1. 技术参数

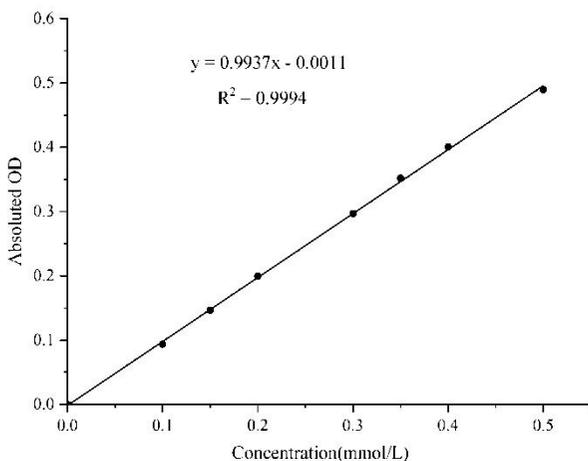
检测范围	0.61 - 49.37 U/L	平均批间差	8.0 %
灵敏度	0.61 U/L	平均批内差	3.6 %
平均回收率	102 %		

### 2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20  $\mu$ L, 按照操作步骤进行实验, OD值如下表所示:

标准品浓度 (mmol/L)	0	0.1	0.15	0.2	0.3	0.35	0.4	0.5
OD 值	0.055	0.149	0.203	0.252	0.353	0.407	0.464	0.546
	0.053	0.147	0.198	0.255	0.349	0.405	0.445	0.541
平均 OD 值	0.054	0.148	0.201	0.254	0.351	0.406	0.455	0.544
绝对 OD 值	0	0.094	0.147	0.200	0.297	0.352	0.401	0.490

② 绘制标曲(如下图):



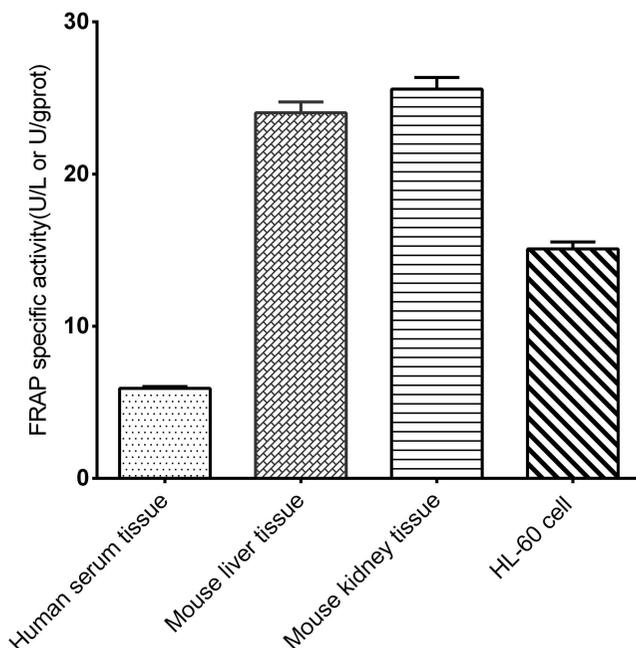
## 附录2 实例分析

例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考):

取稀释5倍的10%小鼠肝组织上清液20  $\mu\text{L}$ , 按说明书操作, 结果如下: 标准曲线:  $y = 0.9937x - 0.0011$ , 对照孔OD值 $A_{\text{对照}}$ 为0.078, 测定孔OD值 $A_{\text{测定}}$ 为0.331,  $\Delta A_{405} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.331 - 0.078 = 0.253$ , 测定出10%小鼠肝组织的蛋白浓度为5.34 gprot/L, 计算结果为:

$$\begin{aligned}\text{FRAP活力(U/gprot)} &= (0.253 + 0.0011) \div 0.9937 \div 10 \times 5 \div 5.34 \times 1000 \\ &= 23.94 \text{ U/gprot}\end{aligned}$$

按说明书操作, 测定人血清(稀释2倍, 加样量20  $\mu\text{L}$ )、小鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度5.34 gprot/L, 稀释5倍, 加样量20  $\mu\text{L}$ )、小鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白含量4.02 gprot/L, 稀释5倍, 加样量20  $\mu\text{L}$ )、HL-60细胞( $1 \times 10^6$ 蛋白浓度0.59 gprot/L, 加样量20  $\mu\text{L}$ )中的FRAP活力(如下图):



## 声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。





