

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K908-M

产品规格: 96T(40 samples)

检测仪器: 酶标仪(445-465 nm)

Elabscience®延胡索酸酶(FUM)比色法测试盒

Fumarase (FUM) Activity Colorimetric 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

网址: 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清(浆)、动物组织及细胞中的延胡索酸酶(FUM)的活力。

检测原理

延胡索酸酶(Fumarase, FUM)又名苹果酸裂合酶、延胡索酸水化酶或富马酸酶,是三羧酸循环中的一个重要的酶,能催化延胡索酸水化合成苹果酸。FUM 是一种胞内酶,广泛存在于动植物内。

本试剂盒的检测原理:延胡索酸酶催化延胡索酸的产物在电子耦合剂的作用下将显色剂还原生成橙黄色产物,在 450 nm 左右检测有最大吸收峰。

本试剂盒检测动物组织和细胞样本时,需测定总蛋白浓度,推荐使用 BCA 法。(货号: E-BC-K318-M)。

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)	提取液 (Extraction Solution)	50 mL×2 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer)	50 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	0.3 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	氧化剂 (Oxidant Reagent)	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	催化剂 (Catalyst)	0.3 mL×1 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	显色剂 (Chromogenic Agent)	1.5 mL×2 支	-20°C 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	0.5 mmol/L 标准品溶液 (0.5 mmol/L Standard Solution)	6 mL×1 瓶	-20°C 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板	
	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(445-465 nm，最佳检测波长 450 nm)，37°C 恒温箱

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25°C。

② 底物工作液的配制：

将试剂一:试剂三按体积比= 19: 1配制，避光待用，现配现用，当天使用有效。

③ 试剂四工作液的配制：

取一支试剂四加入1 mL双蒸水，溶解混匀，未使用完的试剂可在-20°C避光保存7天。

④ 测定工作液的配制：

将试剂二：试剂四工作液：试剂五按体积比= 44: 5: 1配制，避光待用，现配现用，当天使用有效。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	0	0.10	0.15	0.20	0.30	0.35	0.40	0.50
0.5 mmol/L 标准品(μL)	0	40	60	80	120	140	160	200
双蒸水(μL)	200	160	140	120	80	60	40	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本：直接测定。

组织样本：按照组织样本质量(g)：试剂一体积(mL)= 1: 9的比例匀浆，4°C，10000 × g离心10 min，取上清置于冰上待测，留取部分上清用于蛋白浓度测定。

细胞样本：推荐每 1×10^6 个细胞加入200 μL试剂一匀浆。4°C，10000 × g离心10 min，取上清置于冰上待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

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：0.696-33.106 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	200-300	小鼠血清	2-4
10%小鼠肾组织	200-300	小鼠血浆	2-4
10%小鼠心组织	200-300	人血清	2-4
10%小鼠肺组织	200-300	293T 细胞(1×10^6 个)	2-4
大鼠血浆	2-4	Hela 细胞(1×10^6 个)	2-4

注：稀释液为试剂一。

操作步骤

- ① 标准孔：取 20 μL 不同浓度的标准品溶液，加入相应的酶标孔中；
测定孔：取 20 μL 待测样本，加入相应的酶标孔中；
对照孔：取 20 μL 待测样本，加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中的标准孔和测定孔加入 40 μL 底物工作液，向对照孔中加入 40 μL 试剂一。
- ③ 振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 5 min。
- ④ 向③中各孔加入 120 μL 测定工作液。
- ⑤ 向④中各孔加入 20 μL 试剂六。
- ⑥ 振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min，酶标仪于 450 nm 处检测各 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	20	--	--
待测样本(μL)	--	20	20
底物工作液(μL)	40	40	--
试剂一(μL)	--	--	40
振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 5 min。			
测定工作液(μL)	120	120	120
试剂六(μL)	20	20	20
振板 5 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min，酶标仪于 450 nm 处检测各 OD 值。			

本试剂盒检测动物组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法。(货号：E-BC-K318-M)。

结果计算

标准品拟合曲线： $y = ax + b$

① 血清(浆)样本中延胡索酸酶(FUM)活力计算公式：

定义：37°C 条件下，每升血浆(清)每分钟催化底物产生 1 μmol 的产物所需要的酶活为一个活力单位。

$$\text{FUM 活力 (U/L)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div T \times f \times 1000$$

② 组织或细胞样本中延胡索酸酶(FUM)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 μmol 的产物所需要的酶活为一个活力单位。

$$\text{FUM 活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div T \times f \div C_{\text{pr}} \times 1000$$

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

ΔA_{450} : 样本的绝对 OD 值($\Delta A_{450} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$)

T: 反应时间 15 min

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{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

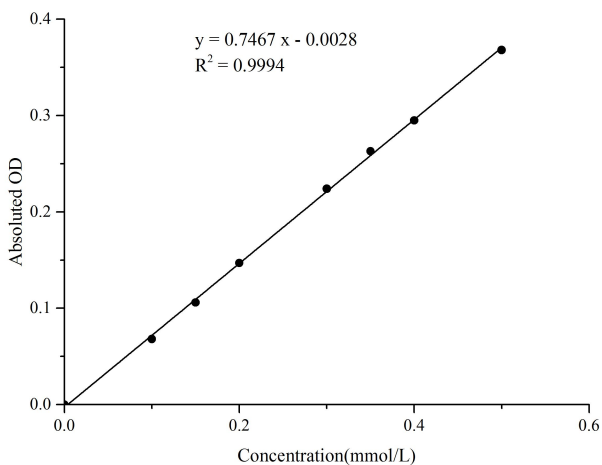
检测范围	0.696-33.106 U/L	批间差	5.8-7.7%
灵敏度	0.696 U/L	批内差	2.4-5.0%
稀释回收率	92-102%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μ 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	0.10	0.15	0.20	0.30	0.35	0.40	0.50
OD 值	0.111	0.190	0.225	0.262	0.342	0.374	0.412	0.486
	0.113	0.181	0.219	0.260	0.337	0.376	0.408	0.481
平均 OD 值	0.112	0.186	0.222	0.261	0.340	0.375	0.410	0.484
绝对 OD 值	0	0.074	0.110	0.149	0.228	0.263	0.298	0.368

② 绘制标曲(如下图):



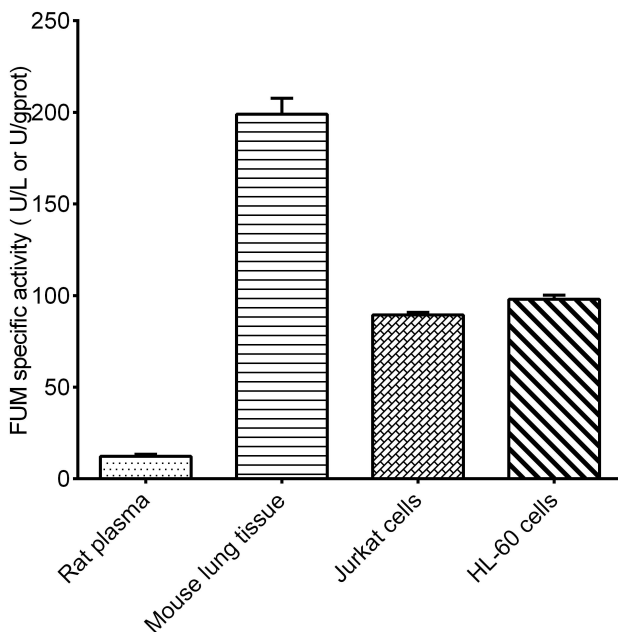
附录2 实例分析

例如小鼠肺组织(数据仅供参考):

取20 μL 稀释250倍的10%小鼠肺组织匀浆上清液加入到酶标板孔中,按操作表操作,结果如下:标准曲线: $y = 0.7467x - 0.0028$, 测定孔OD值 $A_{\text{测定}}$ 为0.155, 对照孔OD值 $A_{\text{对照}}$ 为0.098, $\Delta A_{450} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.155 - 0.098 = 0.057$, 测定出10%小鼠肺组织匀浆的蛋白浓度为6.82 gprot/L计算结果为:

$$\text{FUM活力(U/gprot)} = (0.057 + 0.0028) \div 0.7467 \div 15 \times 250 \div 6.82 \times 1000 = 195.71 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作,测定大鼠血浆(稀释2倍,加样量20 μL)、小鼠肺组织(稀释250倍,10%组织匀浆蛋白浓度为6.82 gprot/L,加样量20 μL)、Jurkat细胞(稀释3倍, 1×10^6 个细胞蛋白浓度为0.855 gprot/L,加样量20 μL)、HL-60细胞(稀释3倍, 1×10^6 个细胞蛋白浓度为0.956 gprot/L,加样量20 μL)中的FUM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。

