

(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-K872-M

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

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：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) | 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 | 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(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 |
|--|----------|------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| 标准品浓度(mmol/L) | 0 | 0.1 | 0.15 | 0.2 | 0.3 | 0.35 | 0.4 | 0.5 |
| 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

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℃，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 1×10^6 个细胞加入200 μL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 | 1×10^6 HL-60 细胞 | 不稀释 |
| 10%小鼠肺组织 | 3-7 | 1×10^6 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 μL 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 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向①中加入 20 μL 试剂二工作液。
- ③ 向标准孔和待测孔中加入 80 μL 测定工作液。
向对照孔中加入 80 μL 试剂一。
- ④ 振板 5 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。
- ⑤ 向③中加入 100 μL 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(μL) | 20 | -- | -- |
| 待测样本(μL) | -- | 20 | 20 |
| 试剂二工作液(μL) | 20 | 20 | 20 |
| 试剂一(μL) | -- | -- | 80 |
| 测定工作液(μL) | 80 | 80 | -- |
| 振板 5 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min | | | |
| 试剂四(μL) | 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℃条件下，每升血清或血浆每分钟催化底物产生 1 μmol 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℃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。

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

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_{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_{pr} : 待测样本的蛋白浓度(gprot/L)

1000: 1 mmol/L=1000 μmol/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

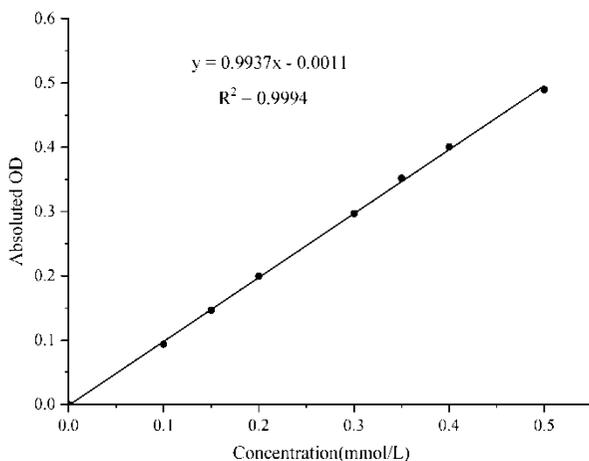
| | | | |
|-------|------------------|-------|-------|
| 检测范围 | 0.61 - 49.37 U/L | 平均批间差 | 8.0 % |
| 灵敏度 | 0.61 U/L | 平均批内差 | 3.6 % |
| 平均回收率 | 102 % | | |

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 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 | 0.1 | 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):



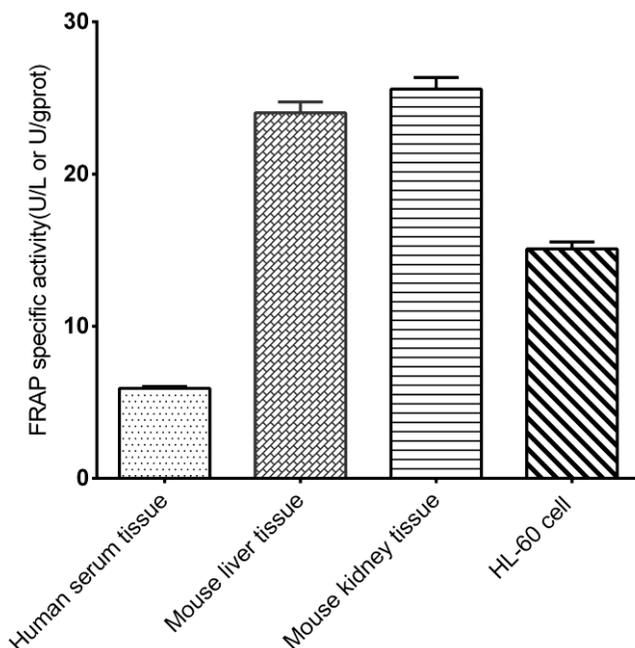
附录2 实例分析

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 μL , 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 μL)、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 μL)、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 μL)、HL-60细胞(1×10^6 蛋白浓度0.59 gprot/L, 加样量20 μL)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。

