

## 延胡索酸检测试剂盒(WST-8法)

产品编号	产品名称	包装
S0517S	延胡索酸检测试剂盒(WST-8法)	100次

### 产品简介:

- 碧云天研发的延胡索酸检测试剂盒(WST-8法) (Fumarate Assay Kit with WST-8)是一种基于WST-8的显色反应，通过比色法，快速、高灵敏地对组织或细胞样品、血清和血浆等生物体液中延胡索酸与延胡索酸盐含量进行检测的试剂盒。
- 延胡索酸(Fumaric acid)，又称富马酸、反丁烯二酸、紫堇酸、别马来酸和别失水苹果酸，为马来酸的反式异构体，分子式为 $C_4H_4O_5$ ，分子量为116.07。延胡索酸是最简单的不饱和和二元羧酸，最早从延胡索中发现，此外多种蘑菇、植物体及新鲜牛肉中含量较高。延胡索酸是研究和应用最广泛的饲料和酸化剂之一，同时也是一种有效的抗应激剂和防腐剂。延胡索酸是酸味最强的固体酸之一，酸度为柠檬酸的2.5倍，而且乳化性、稳定性更好，很多情况下可以替代苹果酸、柠檬酸、苯甲酸用作食品添加剂。延胡索酸作为酸度调节剂、酸化剂、防腐剂、抗氧化助剂、腌制促进剂和香料等广泛用于肉制品、鱼肉制品等食品饮料的加工。
- 延胡索酸作为三羧酸循环(Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle)的重要中间体，在代谢过程中起着重要作用。延胡索酸在动物体内参与机体代谢、组织结构形成和酶活性代谢等一系列生化反应。在哺乳动物肝脏中，延胡索酸盐也是尿素循环的产物，它在细胞质中释放后会转化为苹果酸盐，随后转化为草酰乙酸，同时在细胞质中产生NADH[1-3]。
- 本试剂盒的检测原理如图1所示。延胡索酸在延胡索酸酶(Fumarase)的作用下转化成L-苹果酸(L-Malate)，生成的L-苹果酸在苹果酸脱氢酶(Malate dehydrogenase, MDH)的作用下氧化生成草酰乙酸(Oxalacetic acid, OAA)，在这一反应过程中 $NAD^+$ 被还原为NADH；生成的NADH在电子耦合试剂1-mPMS (1-Methoxy-5-methylphenazinium Methyl Sulfate)的作用下将WST-8还原生成橙黄色的Formazan，在450nm左右有最大吸收峰。反应体系中生成的Formazan与样品中延胡索酸的含量成正比。

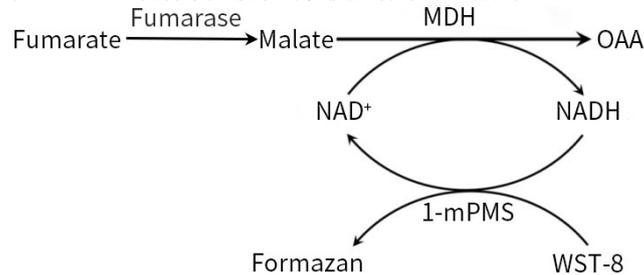


图1. 碧云天延胡索酸检测试剂盒(WST-8法) (S0517)检测原理图。

- 本试剂盒检测灵敏度高，线性范围宽，样品用量少。**本试剂盒在样品体积为20 $\mu$ l时可以检测浓度低达20 $\mu$ M的延胡索酸，在20-500 $\mu$ M (0.4-10nmol)浓度范围内有良好的线性关系。本试剂盒提供了延胡索酸标准溶液，可以通过设置标准曲线(图2)，从而计算出样品中的延胡索酸含量。

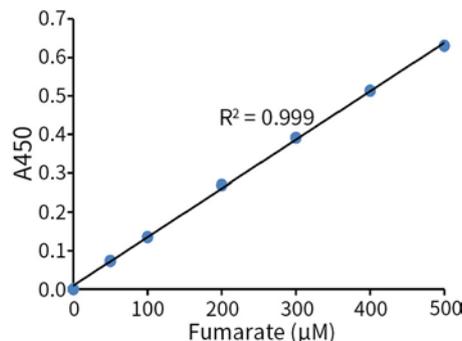


图2. 碧云天延胡索酸检测试剂盒(WST-8法) (S0517)检测延胡索酸标准品的标准曲线。本试剂盒检测延胡索酸标准品，在20-500 $\mu$ M浓度范围内有良好的线性关系。实际检测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中数据仅供参考。

- 本试剂盒提供的检测裂解液有一定的通用性。**使用本试剂盒中的BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay裂解获得的细胞或组织样品，也可以用于碧云天生产的其它代谢类试剂盒中同样使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay进行裂解的样品检测，通用性强；而且还可用于检测蛋白浓度、进行SDS-PAGE或一些较易溶解蛋白的Western检测。
- 本试剂盒使用灵活，检测速度快，适用范围广。**本试剂盒可用于小鼠、大鼠、人等的血清、血浆、尿液等生物体液，细胞培养上

清及组织或细胞样品等的检测，全程约0.5-1小时即可完成。本试剂盒不仅适合少量样本的检测，也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统。

➤ 按照使用说明操作，用于96孔板检测时，本试剂盒小包装可以进行100次检测。

### 包装清单：

产品编号	产品名称	包装
S0517S-1	BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay	20ml
S0517S-2	延胡索酸检测缓冲液	20ml
S0517S-3	酶溶液A	200μl
S0517S-4	酶溶液B	200μl
S0517S-5	显色液	200μl
S0517S-6	底物	200μl
S0517S-7	延胡索酸标准溶液(10mM)	100μl
—	说明书	1份

### 保存条件：

-20°C保存，一年有效。其中显色液和底物须避光保存。

### 注意事项：

- BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay、延胡索酸检测缓冲液(后续简称检测缓冲液)、显色液和底物需要完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。酶溶液和延胡索酸标准溶液使用时应在冰上进行。
- 底物从-20°C拿出在融解过程中可能会有析出，平衡至室温后析出的部分会复溶，不会对检测结果产生影响。
- 血清等样品如在4°C保存，保存时间不得超过2周，否则会影响检测结果的准确性。通常血清样品宜-20°C保存，-80°C保存更佳。
- 为减少稀释液产生的背景带来的误差，样品和标准品的稀释液应该根据样品的种类来定。当样品为BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay制备的细胞或组织的裂解样品时，应使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay稀释，当样品为血液等其它样品时，宜使用检测缓冲液稀释。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明：

#### 1. 样品的准备：

- a. **血液样品的准备：**对于血清样品，将全血在常温如25°C下放置30分钟至2小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4°C约1000-2000×g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀；对于血浆样品，将全血用肝素或者EDTA进行抗凝，4°C约1000-2000×g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。血清和血浆都需置于冰上，如果不能立即检测，也可以分装并短期保存于-20°C或-80°C。对于冻存的样品，在检测前解冻后冰浴存放备用，使用前必须混匀。
- b. **细胞或组织样品的准备：**对于培养的贴壁细胞，PBS (C0221A)洗涤一次并吸净残留液体。对于培养的悬浮细胞，先适当离心(如100-500×g, 5分钟)收集细胞到离心管内，弃上清并吸净残留液体。按照每100万细胞加入100-200μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例加入裂解液，适当吹打，冰浴5-10分钟以充分裂解细胞。4°C约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。对于组织样品，按照每10mg组织加入100μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例，使用TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48) (E6618)、TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600)或玻璃匀浆器在约4°C或冰浴等低温条件下进行匀浆。4°C约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。以上所有操作均需在4°C或冰上进行。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测，可以-20°C或-80°C冻存。
- c. **细胞培养上清样品的准备：**对于贴壁细胞，直接取培养液；对于悬浮细胞，离心取培养液。

#### 2. 试剂盒的准备：

- a. 融解BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay、检测缓冲液、显色液和底物，平衡至室温后混匀备用。其它试剂存放于冰浴备用，使用完毕后宜立即按照试剂盒要求的条件保存。
- b. **显色工作液(Working Solution)的配制：**按照每个检测反应80μl的体积配制适量的显色工作液。均匀混合72μl检测缓冲液(Fumarate Assay Buffer)、2μl酶溶液A (Enzyme Solution A)、2μl酶溶液B (Enzyme Solution B)、2μl显色液(Chromogen Solution)、2μl底物(Substrate)，即可配制成80μl显色工作液(Working Solution)。根据待检测样品(包括标准品)的数量，配制适量的显色工作液。具体配制方法参考下表。配制好的显色工作液如果置于4°C或冰浴避光保存，可以在当天使用，但建议尽量现配现用。

Samples	1	10	20	50
Fumarate Assay Buffer (μl)	72	720	1440	3600
Enzyme Solution A (μl)	2	20	40	100
Enzyme Solution B (μl)	2	20	40	100
Chromogen Solution (μl)	2	20	40	100

Substrate (μl)	2	20	40	100
Working Solution (μl)	80	800	1600	4000

注1: 由于酶溶液的用量较少且易沉降, 必须注意在使用前先轻轻离心一下, 然后适当混匀后再使用。

注2: L-苹果酸和NADH的存在会对延胡索酸的检测产生干扰。如果样品含有L-苹果酸或NADH, 需同时设置样品背景对照孔, 加入不含酶溶液A的显色工作液, 即配制显色工作液时2μl酶溶液A用检测缓冲液替代。计算时样品孔的读数值需要减去样品背景对照孔的读数。

### 3. 样品测定:

- a. 延胡索酸标准曲线的设置: 取25μl延胡索酸标准溶液(10mM), 加入475μl检测裂解液或检测缓冲液(如果检测BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay制备的细胞或组织裂解样品, 使用检测BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay制备的; 如果是血液、上清等无需裂解处理的样品, 使用检测缓冲液), 混匀, 即得浓度为500μM的延胡索酸标准溶液。分别取500μM的延胡索酸标准溶液0、2、4、8、12、16、20μl加入96孔板的标准品孔中, 并用对应的BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay或检测缓冲液补足到20μl, 此时标准曲线的浓度为0、50、100、200、300、400、500μM。

- b. 取1-20μl样品或稀释后的样品至96孔板样品孔中, 并相应地再加入检测裂解液或检测缓冲液至样品孔中, 补足到20μl。同时设置仅含检测裂解液或检测缓冲液的孔为空白对照孔。

注: 为确保数值在标准曲线范围内, 建议进行预实验将样品同时设定多个稀释倍数, 以确定样品的大致浓度。如果数值不在标准曲线范围内, 可调整样品的稀释倍数或者增加样品的量。如果检测BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay制备的细胞或组织裂解样品, 使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay稀释; 如果检测血液、上清等无需裂解处理的样品, 使用检测缓冲液稀释。此处的样品总稀释倍数记为n (例如本步骤中对样品进行了10倍稀释, 加入的‘稀释后的样品’为10μl, 则n=10×20/10=20)。

- c. 各孔加入显色工作液80μl, 混匀, 37°C反应30分钟。

注: 如果吸光度偏低, 可适当延长反应时间。

- d. 在450nm测定吸光度。

- e. 建立标准曲线, 并计算样品中延胡索酸的浓度(记录为A), 如果样品背景对照孔吸光度比较高, 样品的吸光度需要减去样品背景对照孔的吸光度。延胡索酸标准曲线可以参考图2, 在20-500μM浓度范围内有良好的线性关系。延胡索酸浓度C的计算公式如下:

$$C (\mu\text{M}) = A \times n$$

注1: A为步骤3e根据标准曲线确定的稀释后的样品延胡索酸浓度(μM);

n为步骤3b样品总稀释倍数。

注2: 计算获得的延胡索酸浓度其中包含了延胡索酸和延胡索酸根的摩尔浓度, 也可以理解为包含了延胡索酸和延胡索酸盐的摩尔浓度。上述仅为了表述方便, 仅描述为延胡索酸。如有必要, 可根据延胡索酸的分子量160.07计算出样品中延胡索酸的质量浓度(μg/ml) = C × 0.16007。

### 参考文献:

- McFall SM, Abraham B, Narsolis CG, Chakrabarty AM. J Bacteriol. 1997. 179(21):6729-35.
- BACH SJ, HIBBITT KG. Nature. 1960. 188:382-3.
- Wei X, Zhang M, Wang GY, Liu GL, Chi ZM, et al. Synth Syst Biotechnol. 2022. 8(1):33-45.

### 相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C0016/C0017	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒	100次/500次
C0018S/M	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次
S0110S	黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0111S	黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒(WST-8法)	100次
S0112S/M	Amplex Red黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒	100次/500次
S0113S	Amplex Red黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒	100次
S0114S	黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0204S	D-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0208S	L-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0211S/M	Amplex Red胆固醇与胆固醇酯检测试剂盒	100次/500次
S0215S/M	Amplex Red游离脂肪酸检测试剂盒	100次/500次
S0219S/M	Amplex Red甘油三酯检测试剂盒	100次/500次
S0223S/M	Amplex Red甘油检测试剂盒	100次/500次
S0227S	Amplex Red L-乳酸检测试剂盒	100次
S0231S	Amplex Red尿酸与尿酸酶检测试剂盒	100次
S0235S	Amplex Red磷酸盐检测试剂盒	100次
S0239S	Amplex Red乙醇检测试剂盒	100次

S0243S/M	Amplex Red黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒	100次/500次
S0247S	Amplex Red谷氨酸与谷氨酸氧化酶检测试剂盒	100次
S0251S	Amplex Red过氧化氢与过氧化物酶检测试剂盒	100次
S0255S	Amplex Red过氧化氢酶检测试剂盒	100次
S0259S	Amplex Red单胺氧化酶检测试剂盒	100次
S0263S	Amplex Red鞘磷脂酶检测试剂盒	100次
S0267S	Amplex Red胆碱与乙酰胆碱检测试剂盒	100次
S0271S	Amplex Red乙酰胆碱酯酶检测试剂盒	100次
S0275S	Amplex Red磷脂酰胆碱检测试剂盒	100次
S0279S	Amplex Red磷脂酶D检测试剂盒	100次
S0283S	Amplex Red肌酸检测试剂盒	100次
S0287S	Amplex Red肌酸激酶检测试剂盒	100次
S0291S	Amplex Red肌酐检测试剂盒	100次
S0295S	Amplex Red肌氨酸检测试剂盒	100次
S0299S	Amplex Red丙酮酸检测试剂盒	100次
S0303S	Amplex Red丙酮酸激酶检测试剂盒	100次
S0307S	Amplex Red ADP检测试剂盒	100次
S0311S	Amplex Red磷酸烯醇式丙酮酸检测试剂盒	100次
S0315S	Amplex Red丙氨酸检测试剂盒	100次
S0319S	Amplex Red丙氨酸转氨酶检测试剂盒	100次
S0323S	Amplex Red $\alpha$ -酮戊二酸检测试剂盒	100次
S0327S	Amplex Red天冬氨酸检测试剂盒	100次
S0331S	Amplex Red天冬氨酸氨基转移酶检测试剂盒	100次
S0335S	Amplex Red柠檬酸检测试剂盒	100次
S0339S	Amplex Red草酰乙酸检测试剂盒	100次
S0343S	Amplex Red葡萄糖检测试剂盒	100次
S0347S	Amplex Red葡萄糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0351S	Amplex Red果糖检测试剂盒	100次
S0355S	Amplex Red乳糖检测试剂盒	100次
S0359S	Amplex Red半乳糖与乳糖检测试剂盒	100次
S0363S	Amplex Red半乳糖与半乳糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0367S	Amplex Red麦芽糖检测试剂盒	100次
S0371S	Amplex Red麦芽糖与葡萄糖检测试剂盒	100次
S0375S	Amplex Red糖原检测试剂盒	100次
S0379S	Amplex Red磷酸果糖激酶检测试剂盒	100次
S0383S	Amplex Red乙酰辅酶A检测试剂盒	100次
S0387S	Amplex Red辅酶A检测试剂盒	100次
S0391S	Amplex Red乙酰辅酶A合成酶检测试剂盒	100次
S0511S	L-苹果酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0514S	苹果酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0517S	延胡索酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0520S	延胡索酸酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0523S	异柠檬酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0526S	异柠檬酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0529S	Amplex Red琥珀酸检测试剂盒	100次
S0530S	琥珀酸脱氢酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0532S	Amplex Red琥珀酰辅酶A合成酶检测试剂盒	100次
S0535S	支链氨基酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0538S	N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0540S	酪氨酸检测试剂盒(显色法)	100次
S0542S	酪氨酸酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0545S	酪氨酸酶抑制剂筛选试剂盒(显色法)	100次

S0547S	髓过氧化物酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0548S	Amplex Red髓过氧化物酶活性检测试剂盒	100次
S0550S	Amplex Red髓过氧化物酶抑制剂筛选试剂盒	100次

Version 2024.07.12