

延胡索酸酶 (Fumarate Hydratase) 活性试剂盒说明书

(货号: G0869W 微板法 96 样)

一、产品简介:

延胡索酸酶又名延胡索酸水化酶 (EC 4.2.1.2), 存在于线粒体中的富马酸酶是柠檬酸循环中的关键酶之一, 存在于胞质中的富马酸酶与氨基酸和富马酸酯的代谢关系密切。在人类中, 该酶缺失会导致严重的健康问题, 例如胎儿脑畸形, 肌张力低下等。

延胡索酸酶催化延胡索酸转化成 L-苹果酸, L-苹果酸在苹果酸脱氢酶的作用下, 同时使 NAD⁺还原成 NADH, 通过检测 NADH 在 340nm 的增加速率得出延胡索酸酶的活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 120mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 30mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体 0.5mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂四	粉体 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 2.1mL 蒸馏水溶解, 可分装保存。
试剂五	粉体 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解, -20℃保存。
试剂六	液体 μL×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解, -20℃保存。
试剂七	液体 13mL×1 瓶	4℃保存	
试剂八	液体 mL×1 支	4℃保存	

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、低温离心机、研钵。

四、延胡索酸酶活性测定:

1. 线粒体制备 (提示: 整个线粒体的提取过程须保持 4℃低温环境):

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞, 加入 1mL 试剂一, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆, 转移至离心管后于 4℃×700g 离心 10min。
- ② 弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4℃×12000g 离心 10min。上清液即胞浆提取物, 可用于测定胞浆中的延胡索酸酶 (此步可选做), 沉淀为线粒体。
- ③ 在沉淀 (线粒体) 中加入 200μL 试剂二和 2μL 试剂三, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 液体置于冰上用于线粒体中延胡索酸酶活性测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例进行提取, 或按照细胞数量(10^4): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2. 上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25℃) 或于水浴锅 (25℃) 中孵育 15-30min。
- ③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂四	20
试剂五	10
试剂六	10
试剂七	130
混匀, 37°C 孵育 20min	
试剂八	10
混匀, 立即于 340nm 下读取各管吸光值 A1, 37°C 孵育 30min 后读取 A2, ΔA=A2-A1。	

- 【注】1. 若提完的线粒体检测液样本中蛋白含量过高(如呈现浑浊状态),需减少样本加样量(如减至 10μL, 则试剂七相应增加), 则改变后的样本体积 V1 代入计算公式重新计算。
2. 若 ΔA 差值较小, 可以延长反应时间 T (如增至 60min 或更长), 或加大样本量 V1 (如增至 40μL, 则试剂七相应减少), 则改变后的反应时间 T 和样本体积 V1 代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 在 37°C 下, 每毫克组织蛋白每分钟产生 1 nmol NADH 为一个酶活单位。

$$\text{延胡索酸酶活性(nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T$$

$$= 107.2 \times \Delta A \div Cpr$$

2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 在 37°C 下, 每克组织每分钟产生 1 nmol NADH 为一个酶活单位。

$$\text{延胡索酸酶活性(nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 21.7 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 在 37°C 下, 每 1 万个细菌/细胞每分钟产生 1 nmol NADH 为一个酶活单位。

$$\text{延胡索酸酶活性(nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.044 \times \Delta A$$

V1---加入样本体积, 0.02 mL;

V---加入提取液体积, 0.202 mL;

V2---反应体系总体积, 2×10^{-4} L;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

T---反应时间, 30 min;

W---样本质量, g;

ε---NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm;

500---细胞数量, 万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。