

延胡索酸酶 (Fumarate Hydratase) 活性试剂盒说明书

(货号: BP10409W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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 支	-20℃ 避光保存	
试剂四	粉体 1 瓶	-20℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 2.1mL 蒸馏水溶解, 可分装保存; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	粉体 1 支	-20℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解, -20℃ 保存。
试剂六	粉体 1 支	-20℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 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 1 支	4℃ 保存	

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

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 组织样本:

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。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。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 液体样本: 澄清的液体直接检测; 若浑浊则离心后取上清检测。

③ 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一, 超声波破

碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；4℃×12000g 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：试剂一（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（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℃孵育 20min	
试剂八	10
混匀，立即于 340nm 下读取各管吸光值 A1，37℃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、按样本鲜重计算：

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

延胡索酸酶活性(nmol/min/g 鲜重)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10⁹]÷(W×V1÷V)÷T=21.7×ΔA÷W

2、按样本蛋白浓度计算：

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

延胡索酸酶活性(nmol/min/mg prot)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10⁹]÷(V1×Cpr)÷T
=107.2×ΔA÷Cpr

3、按液体体积计算：

酶活定义：在 37℃下，每毫升组织蛋白每分钟产生 1 nmol NADH 为一个酶活单位。

延胡索酸酶活性(nmol/min/mL)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10⁹]÷V1÷T=21.7×ΔA

4、按细菌/细胞密度计算：

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

延胡索酸酶活性(nmol/min/10⁴ cell)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10⁹]÷(500×V1÷V)÷T=0.044×ΔA

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, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; 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。