

延胡索酸酶(富马酸酶)活性测定试剂盒

微板法 96 样

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。

试剂盒组成和配制

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 $\mu\text{L}\times 1$ 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 $\times 1$ 瓶	4℃保存	
试剂八	液体 mL $\times 1$ 支	4℃保存	

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。

延胡索酸酶活性测定

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

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℃ $\times$ 700g 离心 10min。
- ② 弃沉淀，上清液移至另一离心管中，4℃ $\times$ 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 200 μL 试剂二和 2 μL 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℃)。

③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样 本	20
标 准 品	20
蒸 馏 水	10
试 剂 一	10
试 剂 二	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 A ₁ ， 37℃ 孵 育 30min 后 读 取 A ₂ ， $\Delta A = A_2 - A_1$ 。	

[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。

结果计算

1、按照组织质量计算：

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)=[$\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (V_1 \times Cpr) \div T$

=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。

延胡索酸酶活性(nmol/min/g 鲜重)=[$\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \times V_1 \div V) \div T = 21.7 \times \Delta A \div$

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。

延胡索酸酶活性(nmol/min/ 10^4 cell)=[$\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10$

9] $\div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.044 \times \Delta A$

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。