

延胡索酸酶(Fumarate Hydratase)活性试剂盒

分光法 48 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 60mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 15mL×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 3.2mL 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 1.7mL 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 1.6mL

			蒸馏水溶解, -20℃保存。
试剂七	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
试剂八	液体 mL×1 支	4℃保存	

所需的仪器和用品

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、可调式移液器、低温离心机、研钵。

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 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温 (25℃)。

③ 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
-----------	-----

样本	60
试剂四	60
试剂五	30
试剂六	30
试剂七	490
混匀, 37°C 孵育 20min。	
试剂八	30
混匀, 立即于 340nm 下读取各管吸光值 A1, 37°C 孵育 30min 后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

- [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 30 μ L, 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 100 μ L, 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。

$$\begin{aligned}\text{延胡索酸酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 62.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

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)=[$\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (W \times V_1 \div V) \div T = 12.6 \times \Delta A \div W$

3、按细菌/细胞密度计算:

延胡索酸酶活性(nmol/min/ 10^4 cell)=[$\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] $\div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.025 \times \Delta A$

V_1 ---加入样本体积, 0.06 mL; V ---加入提取液体积, 0.202 mL;

V_2 ---反应体系总体积, 7×10^{-4} L; d ---光径, 1cm;

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。