

延胡索酸酶活性检测试剂盒说明书

(货号: SH3014 酶标法 96T)

一、产品简介

延胡索酸酶 (Fumarase, FUM, EC 4.2.1.2), 又称延胡索酸水化酶 (Fumarate hydratase, FH), 存在于线粒体中的延胡索酸酶是三羧酸循环中的关键酶之一, 存在于胞质中的延胡索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。

二、检测原理

延胡索酸酶催化延胡索酸 (Fumarate) 转化生成 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), 同时 NAD^+ 被还原为 NADH。生成的 NADH 在电子耦合试剂 1-mPMS 的作用下将 WST-8 还原生成橙黄色的 Formazan, 该产物在 450 nm 波长处有特征吸收峰。反应体系中生成的 Formazan 与样品中延胡索酸酶的活性成正比。

三、试剂盒组分与规格

试剂名称	规格	保存条件	备注
试剂一	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	液体 1.3mL×1 瓶	-20℃ 保存	
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	液体 1mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂六	粉剂×2 支	-20℃ 保存	临用前甩几下或 4℃ 离心使粉剂落入试管底部, 每支再加 1mL 蒸馏水充分溶解, 用不完的试剂分装后-20℃ 保存。
试剂七	液体 1mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂八	液体 1mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉剂×1 支	-20℃ 保存	

四、保存条件: 4℃ 保存, 6 个月有效。

五、所用到的仪器和用品

酶标仪、台式低温离心机、可调式移液器、96 孔板、匀浆器和蒸馏水。

六、延胡索酸酶活性测定

正式实验前务必选取 2-3 个预期差异较大的样本做测定, 了解本批样本情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、线粒体样本制备 (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 试剂一和 10 μL 试剂三, 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 200 μ L 试剂二和 2 μ L 试剂三，超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），4℃ 12000g 离心 10min，取上清置于冰上用于线粒体中延胡索酸酶活性测定。

2、上机检测

- ①酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。
- ②所有试剂解冻至室温（25℃）或于水浴锅（25℃）中孵育 15-30min。
- ③试剂四、五、六、七、八可按照 140:10:10:10:10 比例配成混合液（一枪加 180 μ L 该混合液，该混合液用多少配多少，现配现用）。
- ④在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（ μ L）	测定管	标准品管
样本	20	
标准品		20
试剂四	140	140
试剂五	10	10
试剂六	10	10
试剂七	10	10
试剂八	10	10

混匀，立即于 450nm 处读取各管吸光值 A1，37℃ 孵育 30min 后读取 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。

【注】：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，可联系我司提供优化建议。

七、结果计算

- 1、根据标准曲线，计算 ΔA 对应的 NADH 浓度 C (单位为 μ mol/mL)。例如本说明书中的标准曲线为 $y = 1.7408x - 0.0035$ ，则 $C = (\Delta A + 0.0035) / 1.7408$ 。

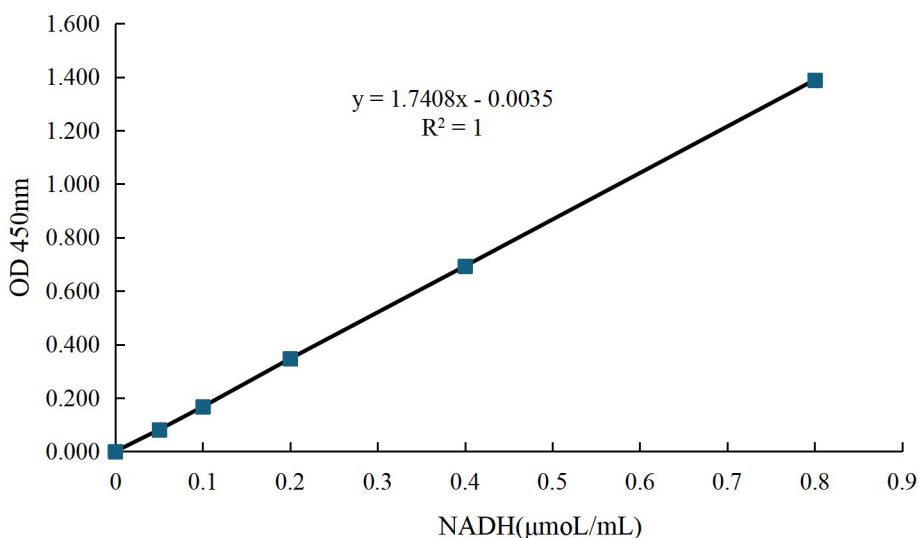


图 1 延胡索酸酶活性检测试剂盒的标准曲线效果图，图中数据仅供参考。

- 2、按样本鲜重计算：

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



延胡索酸酶活性 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ 鲜重) = $C \times V1 \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$

3、按照细菌或细胞数量计算:

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

延胡索酸酶活性 ($\mu\text{mol}/\text{min}/10^4\text{cell}$) = $C \times V1 \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D$

4、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 μmol NADH 为一个酶活单位。

延胡索酸酶活性 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$) = $C \div C_{\text{pr}} \div T \times D$

V---加入提取液体积, 0.202mL;

V1---加入样本体积, 0.02mL;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

W---样本质量, g;

500---细胞数量, 万;

T---反应时间, 30min;

C_{pr}---样本蛋白质浓度, mg/mL, 推荐使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒 (货号: AR0146)。

八、标准曲线制作过程

1、制备标准品母液 (2 $\mu\text{mol}/\text{mL}$): 标准品溶于 1mL 蒸馏水中 (母液可分装并 -20℃ 保存)。

2、将 2 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 的 NADH 标准溶液用蒸馏水稀释成以下浓度: 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。也可以根据实际情况调整浓度。

3、按标准品管加样体系操作, 依据结果即可制作标准曲线。