

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 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°C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°C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°C×700g 离心 10min。

② 弃沉淀,上清液移至另一离心管中,4°C×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°C)。

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 A1，37℃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 10 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 40 μ L，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。

3. 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)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] \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℃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)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] \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。

延胡索酸酶活性(nmol/min/10⁴ cell)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$] \div (500 \times V1 \div V) \div T=0.044 \times Δ

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 \times 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 10³ 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。