Fumarate Hydratase Assay Kits

延胡索酸酶活性试剂盒说明书

货号：BN72641| 方法：紫外分光法 | 规格：48 样

一、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。

二、试剂盒的组成和配制：

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	

三、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。

四、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℃）或于水浴锅（25℃）中孵育 15-30min。

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℃孵育 20min	
试剂八	30
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。	

注意：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，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、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)×10^9]÷(V1×Cpr) ÷T

=62.5×ΔA÷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)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(W×V1÷V)÷T=12.6×ΔA÷W

3、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/10^4 cell)=[ΔA×V2÷(ε×d)×10^9]÷(500×V1÷V)÷T=0.025×ΔA

V1---加入样本体积，0.06 mL；
V---加入提取液体积，0.202 mL；
V2---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。