



延胡索酸酶（富马酸酶）活性测定试剂盒

紫外分光光度法

货号: R45033-48S

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	

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200 μL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, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

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1nmol NADH为一个酶活单位。

延胡索酸酶活性(nmol/min/mg prot)=[$\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9$]÷(V1×Cpr)÷T



$$=62.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{延胡索酸酶活性}(\text{nmol/min/g 鲜重})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$=12.6 \times \Delta A \div W$$

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1nmol NADH为一个酶活单位。

$$\text{延胡索酸酶活性}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell})=[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T$$

$$=0.025 \times \Delta A$$

V1---加入样本体积, 0.06mL;

V---加入提取液体积, 0.202 mL;

V2--- 反应体系总体积, $7 \times 10^{-4}\text{L}$;

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, $6.22 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$;

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。