

延胡索酸酶（Fumarate Hydratase）活性试剂盒说明书

（货号：ADS-W-FM019 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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 支	-20℃ 避光保存	
试剂四	粉体 1 瓶	-20℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 2.1mL 蒸馏水溶解，可分装保存； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	粉体 1 支	-20℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解，-20℃ 保存。
试剂六	粉体 1 支	-20℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 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 1 支	4℃ 保存	

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

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 组织样本：

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。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。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(10⁴)：提取液(mL)为 500~1000：1 的比例进行提取

② 液体样本：澄清的液体直接检测；若浑浊则离心后取上清检测。

③ 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一，超声波破

碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；4°C×12000g 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：试剂一（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），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：

试剂组分（μL）	测定管
样本	20
试剂四	20
试剂五	10
试剂六	10
试剂七	130
混匀，37°C 孵育 20min	
试剂八	10
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 10μL，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 40μL，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。

五、结果计算：

1、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。

$$\text{延胡索酸酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 21.7 \times \Delta A \div W$$

2、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。

$$\begin{aligned} \text{延胡索酸酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 107.2 \times \Delta A \div Cpr \end{aligned}$$

3、按液体体积计算：

酶活定义：在 37°C 下，每毫升组织蛋白每分钟产生 1 nmol NADH 为一个酶活单位。

$$\text{延胡索酸酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 21.7 \times \Delta A$$

4、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。

$$\text{延胡索酸酶活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.044 \times \Delta A$$

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，2×10⁻⁴ L；

d---96 孔板光径，0.5cm；

