

延胡索酸酶活性检测试剂盒(WST-8法)

产品编号	产品名称	包装
S0520S	延胡索酸酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次

产品简介:

- 碧云天研发的延胡索酸酶活性检测试剂盒(WST-8法) (Fumarase Activity Assay Kit with WST-8, Fumarase Assay Kit with WST-8, Fumarate Hydratase Assay Kit with WST-8 or FH Assay Kit with WST-8), 是一种基于WST-8显色反应, 通过比色法, 快速、高灵敏地对细胞、组织或血液等组织样品中延胡索酸酶活性进行检测的试剂盒。
- 延胡索酸酶(Fumarase), 又称反丁烯二酸酶, 其正式名称为延胡索酸水化酶(Fumarate hydratase, FH), 是催化延胡索酸(Fumarate)和L-苹果酸(L-Malate)之间的可逆水合反应的酶, 广泛存在于动植物和微生物中。延胡索酸酶有线粒体和细胞质两种形式, 线粒体形式是三羧酸循环(Tricarboxylic acid cycle, TCA cycle)的关键酶之一, 在TCA中的功能是促进以NADH形式产生能量的过渡步骤[1], 细胞质形式则在氨基酸和延胡索酸的代谢中起着重要作用。延胡索酸酶在胎儿和成人组织中普遍存在, 在皮肤、甲状旁腺、淋巴和结肠中表达水平较高。延胡索酸酶的产生和发展中的突变导致在人类中发现了几种延胡索酸酶相关疾病, 包括子宫的良性间叶质肿瘤、平滑肌瘤病和肾细胞癌, 以及延胡索酸酶缺乏症。人延胡索酸酶缺乏导致严重的健康问题, 如胎儿大脑异常, 低张力和肾细胞癌等[2]。因此, 准确测定延胡索酶活性对了解相关代谢状况以及对延胡索酶缺乏症等的预防、诊断和机理研究等都具有重要意义。
- 本试剂盒的检测原理如图1所示。延胡索酸酶将延胡索酸转化生成L-苹果酸, 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), 在这一反应过程中NAD⁺被还原为NADH; 生成的NADH在电子耦合试剂1-mPMS (1-Methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate)的作用下将WST-8还原生成橙黄色的Formazan, 在450nm左右有最大吸收峰。反应体系中生成的Formazan与样品中延胡索酸酶的活性成正比。

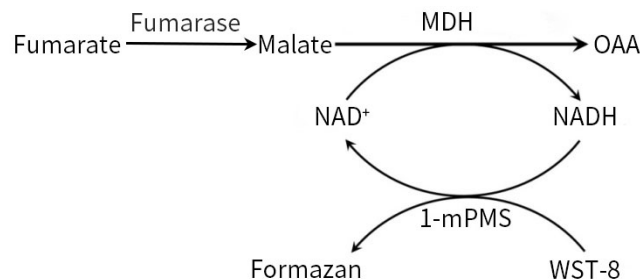


图1. 碧云天延胡索酸酶活性检测试剂盒(WST-8法) (S0520)检测原理图。

- 本试剂盒检测灵敏度高, 线性范围宽, 样品用量少。**本试剂盒在样品体积为20 μ l时可以检测浓度低至13 μ U的延胡索酸酶, 在0.67-33.3U/L活力范围内有良好的线性关系。本试剂盒提供了延胡索酸酶的作用产物NADH的标准溶液, 可以通过设置标准曲线(图2), 从而计算出样品中延胡索酶活力。

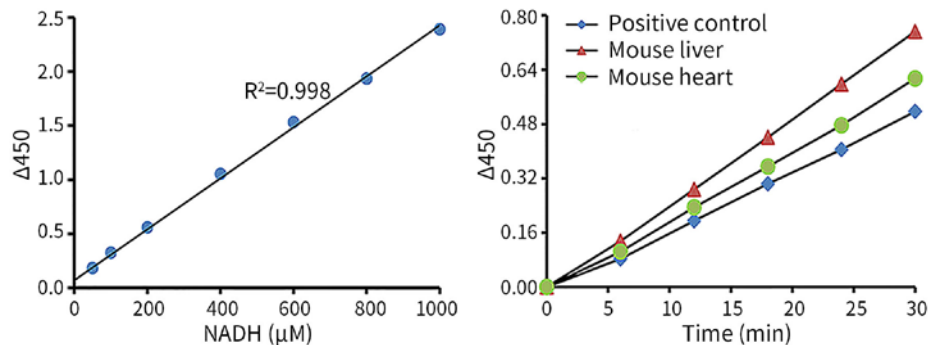


图2. 碧云天延胡索酸酶活性检测试剂盒(WST-8法) (S0520)对NADH的标准曲线、阳性对照、小鼠肝脏和心脏样品的检测效果。左图为本试剂盒对标准品NADH的检测效果, 反应时间为30分钟, 在20-1000 μ M浓度范围内有良好的线性关系; 右图为阳性对照(Positive control)、16 μ g蛋白量小鼠肝脏裂解样品(Mouse liver)和10 μ g蛋白量小鼠心脏裂解样品(Mouse heart)在反应30分钟内的吸光度变化图。实测数据会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中数据仅供参考。

- 本试剂盒提供的检测裂解液有一定的通用性。**使用本试剂盒中的BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay裂解获得的细胞或

组织样品，也可以用于碧云天生产的其它代谢类试剂盒中同样使用BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay进行裂解的样品检测，通用性强；而且还可用于检测蛋白浓度、进行SDS-PAGE或一些较易溶解蛋白的Western检测。

- **本试剂盒使用灵活，检测速度快，适用范围广。**本试剂盒可用于小鼠、大鼠、人等的血清、血浆、尿液等生物体液，细胞培养上清及组织或细胞样品等的检测，全程约0.5-1小时即可完成。本试剂盒不仅适合少量样本的检测，也非常适合高通量筛选(High-throughput screening)的自动化操作系统。
- 按照使用说明操作，用于96孔板检测时，本试剂盒小包装可以进行100次检测。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
S0520S-1	BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay	20ml
S0520S-2	延胡索酸酶检测缓冲液	20ml
S0520S-3	酶溶液	200μl
S0520S-4	阳性对照(100X)	20μl
S0520S-5	显色液	200μl
S0520S-6	底物	200μl
S0520S-7	NADH	5mg
—	说明书	1份

保存条件：

-20℃保存，一年有效。其中显色液、底物和NADH须避光保存。NADH配制成溶液后，须适当分装后-80℃保存。

注意事项：

- BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay、延胡索酸酶检测缓冲液(后续简称检测缓冲液)、显色液和底物需要完全解冻并平衡至室温后再使用，否则会影响检测结果。其它试剂在使用时应在冰上进行。
- 底物从-20℃拿出在融解过程中可能会有析出，平衡至室温后析出的部分会复溶，不会对检测结果产生影响。
- 血清等样品如在4℃保存，保存时间不得超过2周，否则会影响检测结果的准确性。通常血清样品宜-20℃保存，-80℃保存更佳。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 样品的准备：

- 血液样品的准备：对于血清样品，将全血在常温如25℃下放置30分钟至2小时，不要剧烈摇晃以免溶血，待全血自然凝固并析出血清后，4℃约1000-2000×g离心10分钟，取黄色上清即得血清，注意不要吸取白色或淡黄色沉淀；对于血浆样品，将全血用肝素或者EDTA进行抗凝，4℃约1000-2000×g离心10分钟，取黄色或淡黄色上清即得血浆，注意不要吸取白色沉淀。血清和血浆都需置于冰上，如果不能立即检测，也可以分装并短期保存于-20℃或-80℃。对于冻存的样品，在检测前解冻后冰浴存放备用，使用前必须混匀。
- 细胞或组织样品的准备：对于培养的贴壁细胞，PBS (C0221A)洗涤一次并吸净残留液体。对于培养的悬浮细胞，先适当离心(如100-500×g, 5分钟)收集细胞到离心管内，弃上清并吸净残留液体。按照每100万细胞加入100-200μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例加入裂解液，适当吹打，冰浴5-10分钟以充分裂解细胞。4℃约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。对于组织样品，按照每10mg组织加入100μl BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay的比例，使用TissueMaster™高通量组织研磨仪(1.5/2ml×48) (E6618)、TissueMaster™手持式组织研磨仪(E6600)或玻璃匀浆器在约4℃或冰浴等低温条件下进行匀浆。4℃约12,000×g离心3-5分钟，取上清用于后续检测。以上所有操作均需在4℃或冰上进行。制备好的细胞或组织样品如果不能立即检测，可以-20℃或-80℃冻存。
- 细胞培养上清样品的准备：对于贴壁细胞，直接取培养液；对于悬浮细胞，离心取培养液。

2. 试剂盒的准备：

- 融解BeyoLysis™ Buffer A for Metabolic Assay、检测缓冲液、显色液和底物，平衡至室温后混匀备用。其它试剂存放于冰浴备用，使用完毕后宜立即按照试剂盒要求的条件保存。
- 10mM NADH标准溶液的配制：在本试剂盒提供的5mg NADH中加入655μl检测缓冲液，充分溶解并混匀，即为10mM的NADH标准溶液。除待用部分外，其余NADH标准溶液适当分装后-80℃避光保存。
- 显色工作液(Working Solution)的配制：按照每个检测反应80μl的体积配制适量的显色工作液。均匀混合74μl检测缓冲液(Fumarate Assay Buffer)、2μl酶溶液(Enzyme Solution)、2μl显色液(Chromogen Solution)、2μl底物(Substrate)，即可配制成80μl显色工作液(Working Solution)。根据待检测样品(包括标准品)的数量，配制适量的显色工作液。具体配制方法参考下表。配制好的显色工作液如果置于4℃或冰浴避光保存，可以在当天使用，但建议尽量现配现用。注：由于酶溶液的用量较少且易沉降，必须注意在使用前先轻轻离心一下，然后适当混匀后再使用。

Samples	1	10	20	50
Fumarate Assay Buffer (μl)	74	740	1480	3700
Enzyme Solution (μl)	2	20	40	100

Chromogen Solution (μl)	2	20	40	100
Substrate (μl)	2	20	40	100
Working Solution (μl)	80	800	1600	4000

注：当样品有背景会对检测产生干扰需时，需同时设置样品背景对照孔，加入不含底物的显色工作液，即配制显色工作液时2μl底物用检测缓冲液替代。计算时样品孔的读数值需要减去样品背景对照孔的读数。

3. 样品测定：

- NADH标准曲线的设置：取10μl NADH标准溶液(10mM)，加入90μl检测缓冲液，混匀，配制成浓度为1mM的NADH标准溶液。分别取1mM的NADH标准溶液0、2、4、8、12、16、20μl加入96孔板的标准品孔中，并用检测缓冲液补足到20μl，此时标准曲线的浓度为0、100、200、400、600、800、1000μM。
- 阳性对照的设置：用检测缓冲液将阳性对照(100X)做100倍的稀释，然后取20μl加入96孔板作为阳性样品。例如取阳性对照1μl，加入检测缓冲液99μl，混匀后取20μl加入96孔板作为阳性样品。
- 取1-20μl样品或稀释后的样品至96孔板样品孔中，并相应地加入检测缓冲液至样品孔中，补足到20μl。同时设置仅含检测缓冲液的孔为空白对照孔。

注：为确保数值在标准曲线范围内，建议进行预实验将样品同时设定多个稀释倍数，以确定样品的大致浓度。如果数值不在标准曲线范围内，可调整样品的稀释倍数或者增加样品的量。此处的样品总稀释倍数记为n (例如本步骤中对样品进行了10倍稀释，加入的‘稀释后的样品’为10μl，则n=10×20/10=20)。

- 各孔加入显色工作液80μl，混匀。
- 立即使用适当的酶标仪或微量紫外分光光度计测定A450，此时记录为0分钟读值A₁。
- 37°C反应10-30分钟，反应时间记为T，测定A450，记为A₂。信号的增强取决于延胡索酸酶催化产生的NADH的量， $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

注：为取得最佳的检测效果，反应时间可以根据待测样品中的延胡索酸酶活性进行调整，但是必须确保读数在标准曲线范围内。对于延胡索酸酶活性较高的样品，建议测定总时间为20分钟或30分钟，对应的测定间隔时间设为2分钟或5分钟；对于延胡索酸酶活性较低的样品，可以延长测定总时间为1至2小时，对应的测定间隔时间设为10或20分钟。也可以连续测定30分钟，每隔1或2分钟测定1次，最后取呈线性的时间点前的数据用于分析和计算。

- 建立NADH标准曲线，将ΔA代入标准曲线，即可算出在反应时间内样品中延胡索酸酶催化产生的NADH浓度(记录为B)。NADH标准曲线可以参考图2，在20-1000μM浓度范围内有良好的线性关系。样品延胡索酸酶的活性(Fumarase Activity)计算公式如下：

$$\text{Fumarase Activity (U/L)} = B \times n / T$$

注：B为步骤3g根据标准曲线确定的NADH浓度(μM)；

n为步骤3c样品总稀释倍数；

T为步骤3f的反应时间(min)。

延胡索酸酶活力单位的定义：1个酶活力单位(unit, U)在37°C条件下，在1分钟内可以催化生成1μmol NADH。

参考文献：

- Yogev O, Naamati A, Pines O. FEBS J. 2011. 278(22): 4230-4242.
- Estévez M, Skarda J, Spencer J, Banaszak L, Weaver TM. Protein Sci. 2002. 11(6):1552-1557.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0016/C0017	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒	100次/500次
C0018S/M	乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒(WST-8法)	100次/500次
S0110S	黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0111S	黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒(WST-8法)	100次
S0112S/M	Amplex Red黄嘌呤氧化酶活性检测试剂盒	100次/500次
S0113S	Amplex Red黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选试剂盒	100次
S0114S	黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0204S	D-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0208S	L-乳酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0211S/M	Amplex Red胆固醇与胆固醇酯检测试剂盒	100次/500次
S0215S/M	Amplex Red游离脂肪酸检测试剂盒	100次/500次
S0219S/M	Amplex Red甘油三酯检测试剂盒	100次/500次
S0223S/M	Amplex Red甘油检测试剂盒	100次/500次
S0227S	Amplex Red L-乳酸检测试剂盒	100次
S0231S	Amplex Red尿酸与尿酸酶检测试剂盒	100次
S0235S	Amplex Red磷酸盐检测试剂盒	100次

S0239S	Amplex Red乙醇检测试剂盒	100次
S0243S/M	Amplex Red黄嘌呤/次黄嘌呤检测试剂盒	100次/500次
S0247S	Amplex Red谷氨酸与谷氨酸氧化酶检测试剂盒	100次
S0251S	Amplex Red过氧化氢与过氧化物酶检测试剂盒	100次
S0255S	Amplex Red过氧化氢酶检测试剂盒	100次
S0259S	Amplex Red单胺氧化酶检测试剂盒	100次
S0263S	Amplex Red鞘磷脂酶检测试剂盒	100次
S0267S	Amplex Red胆碱与乙酰胆碱检测试剂盒	100次
S0271S	Amplex Red乙酰胆碱酯酶检测试剂盒	100次
S0275S	Amplex Red磷脂酰胆碱检测试剂盒	100次
S0279S	Amplex Red磷脂酶D检测试剂盒	100次
S0283S	Amplex Red肌酸检测试剂盒	100次
S0287S	Amplex Red肌酸激酶检测试剂盒	100次
S0291S	Amplex Red肌酐检测试剂盒	100次
S0295S	Amplex Red肌氨酸检测试剂盒	100次
S0299S	Amplex Red丙酮酸检测试剂盒	100次
S0303S	Amplex Red丙酮酸激酶检测试剂盒	100次
S0307S	Amplex Red ADP检测试剂盒	100次
S0311S	Amplex Red磷酸烯醇式丙酮酸检测试剂盒	100次
S0315S	Amplex Red丙氨酸检测试剂盒	100次
S0319S	Amplex Red丙氨酸转氨酶检测试剂盒	100次
S0323S	Amplex Red α -酮戊二酸检测试剂盒	100次
S0327S	Amplex Red天冬氨酸检测试剂盒	100次
S0331S	Amplex Red天冬氨酸氨基转移酶检测试剂盒	100次
S0335S	Amplex Red柠檬酸检测试剂盒	100次
S0339S	Amplex Red草酰乙酸检测试剂盒	100次
S0343S	Amplex Red葡萄糖检测试剂盒	100次
S0347S	Amplex Red葡萄糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0351S	Amplex Red果糖检测试剂盒	100次
S0355S	Amplex Red乳糖检测试剂盒	100次
S0359S	Amplex Red半乳糖与乳糖检测试剂盒	100次
S0363S	Amplex Red半乳糖与半乳糖氧化酶检测试剂盒	100次
S0367S	Amplex Red麦芽糖检测试剂盒	100次
S0371S	Amplex Red麦芽糖与葡萄糖检测试剂盒	100次
S0375S	Amplex Red糖原检测试剂盒	100次
S0379S	Amplex Red磷酸果糖激酶检测试剂盒	100次
S0383S	Amplex Red乙酰辅酶A检测试剂盒	100次
S0387S	Amplex Red辅酶A检测试剂盒	100次
S0391S	Amplex Red乙酰辅酶A合成酶检测试剂盒	100次
S0511S	L-苹果酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0514S	苹果酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0517S	延胡索酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0520S	延胡索酸酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0523S	异柠檬酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0526S	异柠檬酸脱氢酶活性检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0529S	Amplex Red琥珀酸检测试剂盒	100次
S0530S	琥珀酸脱氢酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0532S	Amplex Red琥珀酰辅酶A合成酶检测试剂盒	100次
S0535S	支链氨基酸检测试剂盒(WST-8法)	100次
S0538S	N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0540S	酪氨酸检测试剂盒(显色法)	100次
S0542S	酪氨酸酶活性检测试剂盒(显色法)	100次

S0545S	酪氨酸酶抑制剂筛选试剂盒(显色法)	100次
S0547S	髓过氧化物酶活性检测试剂盒(显色法)	100次
S0548S	Amplex Red髓过氧化物酶活性检测试剂盒	100次
S0550S	Amplex Red髓过氧化物酶抑制剂筛选试剂盒	100次

Version 2024.07.12