

顺乌头酸酶（ACO）活性检测试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义

顺乌头酸酶（aconitase），三羧酸循环中的酶，催化柠檬酸转变为异柠檬酸。柠檬酸本身不易氧化，在顺乌头酸酶作用下，通过脱水与加水反应，使羟基由β碳原子转移到α碳原子上，生成易于脱氢氧化化的异柠檬酸，为进一步的氧化脱羧反应作准备。

测定原理

ACO催化柠檬酸转化成异柠檬酸，异柠檬酸氧化脱羧将NAD⁺还原生成NADH，导致340nm处光吸收上升。

需自备的仪器和用品

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

试剂一：100mL×1瓶，-20℃保存；

试剂二：20mL×1瓶，-20℃保存；

试剂三：1.5mL×1支，-20℃保存；

试剂四：液体20mL×1瓶，4℃保存；

试剂五：液体5mL×1瓶，4℃保存；

试剂六：粉剂×1支，-20℃保存；临用前加1.5mL蒸馏水充分溶解；现配现用

试剂七：粉剂×1支，4℃保存；临用前加12mL试剂四充分溶解；

工作液：临用前在12mL试剂七中加入1mL蒸馏水、1mL试剂四、1mL试剂五、1mL试剂六充分混匀

样本的前处理：

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

1. 称取约0.1g组织或收集500万细胞，加入1mL试剂一和10μL试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 将匀浆转入离心管内600g，4℃离心5min。
3. 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心10min。
4. 上清液即胞浆提取物，可用于测定胞质顺乌头酸酶活性。
5. 在步骤④的沉淀中加入200μL试剂二和2μL试剂三，超声波破碎（冰浴，功率20%或200W，超声3秒，间隔10秒，重复30次），用于线粒体顺乌头酸酶活性测定。

测定步骤

1. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
2. 样本测定

（1）将工作液，置于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴10min；现配现用；若分次用将工作液分装后于-20℃保存，一星期内可用。

（3）在微量石英比色皿或96孔板中加入40μL样本160μL工作液，混匀，立即记录340nm处20s时的吸光值A1和3min20s后的吸光值A2，计算ΔA=A2-A1。

ACO活性计算

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每mg组织蛋白每分钟生成1 nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$\text{ACO活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 268 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每g组织每分钟生成1 nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$\text{ACO (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 54 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每1万个细菌或细胞每分钟生成1 nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$\text{ACO活性 (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.108 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.04 mL；V样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，3min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万。

b.用96孔板测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每mg组织蛋白每分钟生成1 nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$\text{ACO活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 536 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义：每g组织每分钟生成1 nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$\text{ACO (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 108 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每1万个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成1 nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$\text{ACO活性 (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.216 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol /cm；d：96孔板光径，0.5cm；V样：加入样本体积，0.04 mL；V样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，3min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万。