

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0891

Size: 100T/96S

顺乌头酸酶 (ACO) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、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。

四、试剂的组成和配置:

| 种类 | 试剂规格 | 储存条件 | 使用方法及注意事项 |
|-----|---------------|----------|--------------------------|
| 试剂一 | 100mL × 1 瓶 | -20°C 保存 | |
| 试剂二 | 20mL × 1 瓶 | -20°C 保存 | |
| 试剂三 | 1.5mL × 1 支 | -20°C 保存 | |
| 试剂四 | 液体 20mL × 1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂五 | 液体 5mL × 1 瓶 | 4°C 保存 | |
| 试剂六 | 粉剂 × 1 支 | -20°C 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 | | |

五、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 10uL 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°C离心 5min。
- 3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4°C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 200uL 试剂二和 2uL 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。

六、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°C（哺乳动物）或 25°C（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。

(2) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 40 μL 样本 160 μL 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 $\Delta A=A2-A1$ 。

七、ACO 活性计算

- 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。

$$\text{ACO 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$T = 0.108 \times \Delta A$$

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。

● 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。

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

(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。

$$\text{ACO 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 0.216 \times \Delta A$$

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