

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

顺乌头酸酶（ACO）活性检测试剂盒说明书

分光光度法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

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、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	50mL×1 瓶	-20℃保存	-
试剂二	10mL×1 瓶	-20℃保存	-
试剂三	1mL×1 支	-20℃保存	-
试剂四	液体 60mL×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 3mL 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 36mL 试剂四充分溶解；
工作液	临用前在 36mL 试剂七中加入 3mL 蒸馏水、3mL 试剂四、3mL 试剂五、3mL 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 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℃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 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。

测定步骤

1、分光光度计预热 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 1mL 石英比色皿中加入 100 μL 样本 900 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 $\Delta A=A2-A1$

ACO 活性计算

用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。

ACO 活性 (nmol/min/mg prot) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 536 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

(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。

ACO (nmol/min/g 鲜重) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 108 \times \Delta A \div W$

(3) 按细菌或细胞密度计算

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

ACO 活性 (nmol/min/10⁴ cell) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.722 \times \Delta A$

V 反总：反应体系总体积，0.001 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，0.1 mL; V 样总：加入提取液体积，0.202 mL; T：反应时间，3min; C_{pr}：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。