

顺乌头酸酶（ACO）活性检测试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

注 意：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、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：

试剂一：50mL×1 瓶， -20°C 保存；

试剂二：10mL×1 瓶， -20°C 保存；

试剂三：1mL×1 支， -20°C 保存；

试剂四：液体 60mL×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 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 10 μL 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 200 μL 试剂二和 2 μL 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。

（3）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。

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

(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。

$$\text{ACO 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.722 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，0.001 L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L / mol / cm}$ ；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；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。