

## 顺乌头酸酶（ACO）活性检测试剂盒说明书

微量法 100 管/96 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  $\beta$  碳原子转移到  $\alpha$  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  $\text{NAD}^+$  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， $-20^{\circ}\text{C}$  保存；

试剂二：20mL×1 瓶， $-20^{\circ}\text{C}$  保存；

试剂三：1.5mL×1 支， $-20^{\circ}\text{C}$  保存；

试剂四：液体 20mL×1 瓶， $4^{\circ}\text{C}$  保存；

试剂五：液体 5mL×1 瓶， $4^{\circ}\text{C}$  保存；

试剂六：粉剂×1 支， $-20^{\circ}\text{C}$  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， $4^{\circ}$  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 10 $\mu\text{L}$  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， $4^{\circ}\text{C}$  离心 5min。
- 3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g， $4^{\circ}\text{C}$  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 $\mu\text{L}$  试剂二和 2 $\mu\text{L}$  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  $37^{\circ}\text{C}$ （哺乳动物）或  $25^{\circ}\text{C}$ （其它物种）水浴 10min；现配现用；若分次用将工作液分装后于  $-20^{\circ}$  保存，一星期内可用。

(3) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 40  $\mu$ L 样本 160  $\mu$ L 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  $\Delta A=A_2-A_1$ 。

### 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。

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

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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。

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

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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。