

顺乌头酸酶（ACO）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYHD1-C24	顺乌头酸酶（ACO）活性检测试剂盒 说明书	24T	常量法
AYHD1-C48		48T	

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、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(24T)	试剂装量(48T)	保存条件
提取液	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 6mL×1 瓶	液体 12mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	液体 6mL×1 瓶	液体 12mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂三	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃ 保存
试剂三：用时每瓶粉剂加入蒸馏水 6mL，混匀充分溶解，-20℃ 保存 1 周，避免反复冻融。			
试剂四	液体 6mL×1 瓶	液体 12mL×1 瓶	-20℃ 保存
试剂四：易挥发试剂，使用后-20℃ 避光密封保存，避免反复冻融。			

四、操作步骤：

样本前处理

- 1、组织：按照组织质量（g）:提取液(mL)为1:10 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4℃ 离心 10 min，取上清置冰上待测。
- 2、细菌、细胞：按照细胞数量 10⁴ 个: 提取液体积（mL）500~1000:1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3s，间隔 7s，总时间 3 min），5000 rpm，4℃ 离心 10min，取上清置冰上待测。

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. 测定前将试剂恢复至常温;
3. 操作表:

	测定管	空管
样品 (μL)	200	-
双蒸水 (μL)	-	200
试剂一 (μL)	200	200
试剂二 (μL)	200	200
试剂三 (μL)	200	200
试剂四 (μL)	200	200
记录 340nm 处 20s 时吸光值 A1 和 5min20s 时的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A1 - A2$ 测定。 $\Delta A_{空白} = A1_{空白} - A2_{空白}$; $\Delta A = \Delta A_{测定} - \Delta A_{空白}$ 。(空白管只做 1-2 管)		

四、顺乌头酸酶 (ACO) 活性计算:

1、组织、细胞样本顺乌头酸酶 (ACO) 计算

(1) 按样本鲜重计算:

单位定义: 每克组织每分钟生成 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

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

(2) 按样本蛋白浓度计算:

单位定义: 每毫克蛋白每分钟生成 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

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

(3) 按细菌或细胞数量计算:

单位定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

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

V 反总: 反应体系总体积, 1×10^{-3} L;

ε: NADH, 6.22×10^3 L/mol/cm;

d: 比色皿光径, 1cm;

V 样: 加入样本体积, 0.2mL;

V 样总: 加入提取液体积, 1mL;

T: 反应时间, 5min;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

10^9 : 单位换算系数, $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$;

W: 样本质量, g;

500: 细菌或细胞总数, 500 万。

五、 注意事项:

1、实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测;