

顺乌头酸酶（ACO）检测试剂盒（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。

试剂组成和配制：

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。

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

- (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。

$$\begin{aligned} \text{ACO (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T \\ &= 108 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

- (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。

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

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。