



顺乌头酸酶活性检测试剂盒

ACO Assay Kit

微量法

产品编号: AK412M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK412-A	100mL×1 瓶	-20℃保存;
AK412-B	20mL×1 瓶	-20℃保存;
AK412-C	1.5mL×1 支	-20℃保存;
AK412-D	20mL×1 瓶	4℃保存;
AK412-E	5mL×1 瓶	4℃保存;
AK412-F	粉剂×1 支	-20℃保存; 临用前加 1.5mL 蒸馏水充分溶解, 现配现用;
AK412-G	粉剂×1 支	4℃保存; 临用前加 12mL AK412-D 充分溶解;
工作液配制: 临用前在 12mL AK412-G 中加入 1mL 蒸馏水、1mL AK412-D、1mL AK412-E、1mL AK412-F 充分混匀		

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 顺乌头酸酶 (Aconitase, ACO) 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。

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。

自备用品:

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 (UV 板)、研钵、冰和蒸馏水。

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 AK412-A 和 10uL AK412-C, 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 AK412-B 和 2uL AK412-C, 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℃ (哺乳动物) 或 25℃ (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) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 40 μ L 样本 160 μ 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 酶活性计算:

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。

$$\text{ACO 活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 268 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{ACO (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 54 \times \Delta A \div W$$

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。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d : 比色皿光径, 1cm;

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.04 mL; $V_{\text{样总}}$: 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。

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。

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

2. 按样本鲜重计算

单位定义: 每 g 组织每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活性单位。

$$\text{ACO (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 108 \times \Delta A \div W$$

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。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d : 96 孔板光径, 0.5cm;

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.04 mL; $V_{\text{样总}}$: 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。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))