

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

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。

组成：

产品名称	KC018-50T/48S	Storage
试剂一：液体	50ml	-20°C
试剂二：液体	10ml	-20°C
试剂三：液体	1ml	-20°C
试剂四：液体	60ml	4°C
试剂五：液体	5ml	4°C
试剂六：粉剂	1 支	-20°C
试剂七：粉剂	1 支	4°C
说明书	一份	

试剂六：粉剂 \times 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 \times 1 支，4°C 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

自备仪器和用品：

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。

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：

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线：0518-81263339

官网：<http://www.bio149.com>

- 1、称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1ml 试剂一和 10 μ 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 $^{\circ}$ C 离心 5min。
- 3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4 $^{\circ}$ 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 μ l 试剂二和 2 μ 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 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或 25 $^{\circ}$ 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 1ml 石英比色皿中加入 100 μ l 样本 900 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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

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。
$$\text{ACO 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 536 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$
- (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。
$$\text{ACO (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 108 \times \Delta A \div W$$
- (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， 6.22×10^3 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。

