

## 顺乌头酸酶 (Aconitase) 活性试剂盒说明书

(货号: ADS-W-S018 微板法 96 样)

### 一、产品简介:

顺乌头酸酶(Aconitase, EC 4.2.1.3), 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。

顺乌头酸酶(Aconitase)催化柠檬酸转化成异柠檬酸, 异柠檬酸在异柠檬酸脱氢酶的作用下氧化脱羧将  $\text{NADP}^+$  还原生成  $\text{NADPH}$ , 通过检测  $\text{NADPH}$  在 340nm 处光吸收的增加速率, 即可得出顺乌头酸酶活性大小。

### 二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 120mL×1 瓶	-20°C保存	
试剂二	液体 30mL×1 瓶	-20°C保存	
试剂三	液体 0.5mL×1 支	-20°C避光保存	
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	A: 粉体 1 支 B: 粉体 1 支	4°C保存	临用前分别加 0.5mL 蒸馏水于 A 和 B 中, 使其完全溶解, 4°C 保存一个月。
		-20°C避光保存	
试剂六	液体 1 支	-20°C保存	临用前甩几下使液体落入底部, 再加 1.026mL 蒸馏水混匀, 可分装保存。
试剂七	粉体 1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 17.5mL 试剂四溶解。
试剂八	粉体 1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解。

### 三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、低温离心机、研钵。

### 四、顺乌头酸酶活性测定:

#### 1、线粒体制备 (提示: 整个线粒体的提取过程须保持 4°C 低温环境):

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞, 加入 1mL 试剂一, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆, 转移至离心管后于 4°C×700g 离心 10min。
- ② 弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4°C×12000g 离心 10min。上清液即胞浆提取物, 可用于测定胞浆中的顺乌头酸酶 (此步可选做), 沉淀为线粒体。
- ③ 在沉淀 (线粒体) 中加入 200 $\mu$ L 试剂二和 2 $\mu$ L 试剂三, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 液体置冰上用于线粒体中顺乌头酸酶测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取, 或按照细胞数量 ( $10^4$ ): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

- 2、试剂五 A 与 B 以 1:1 比例混匀制备成激活剂 (现配现用), 取③步中得到的液体 100 $\mu$ L 至新 EP 管中, 加入 5 $\mu$ L 的激活剂, 置于冰上孵育 1 小时, 若浑浊则 4°C×12000g 离心 5min 后取上清液作为样本直接检测。

#### 3、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂六	10
试剂七	160
混匀，37℃条件下，孵育 5min	
试剂八	10
混匀，37℃条件下，立即于 340nm 处读取 A1，3min 后读取 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。	

- 【注】1. 若提完的线粒体检测液样本中蛋白含量过高（如呈现浑浊状态），或起始值 A1 超过 1.5 需减少样本加样量（如减至 10μL，则试剂七相应增加），则改变后的样本体积 V1 代入计算公式重新计算。
2. 若  $\Delta A$  差值较小，可以延长反应时间 T（如增至 10min 或更长），或加大样本量 V1（如增至 40μL，则试剂七相应减少），则改变后的反应时间 T 和样本体积 V1 代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算：

### 1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：在 37℃下，每毫克组织蛋白每分钟产生 1 nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{顺乌头酸酶活性 (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 1071.8 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

### 2、按样本鲜重计算：

酶活定义：在 37℃下，每克组织每分钟产生 1 nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{顺乌头酸酶活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 227.2 \times \Delta A \div W$$

### 3、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：在 37℃下，每 1 万个细菌/细胞每分钟产生 1 nmol NADPH 为一个酶活单位。

$$\text{顺乌头酸酶活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.454 \times \Delta A \div W$$

V1---加入样本体积，0.02 mL；

V---加入提取液体积，0.212 mL；

V2---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L；

d---96 孔板光径，0.5cm；

T---反应时间，3min；

W---样本质量，g；

$\epsilon$ ---NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L/mol/cm；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。