

顺乌头酸酶（Aconitase）活性试剂盒说明书

（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 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。

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 NADP^+ 还原生成 NADPH , 通过检测 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℃ 保存	
试剂二	液体 30mL×1 瓶	-20℃ 保存	
试剂三	液体 0.5mL×1 瓶	-20℃ 保存	
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	A: 粉体 mg×1 支 B: 粉体 mg×1 支	4℃ 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℃ 保存一个月。
试剂六	液体 μL ×1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下使液体落入底部, 再加 0.75mL 蒸馏水混匀, 可分装保存。
试剂七	粉体 mg×1 瓶	4℃ 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 mg×1 支	4℃ 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℃ 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℃×700g 离心 10min。
- ② 弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4℃×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 μL 试剂二和 2 μL 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 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 μL 至新 EP 管中, 加入 5 μL 的**激活剂**, 置于冰上孵育 1 小时后作为样本直接检测。

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°C条件下, 孵育 5min	
试剂八	10
混匀, 37°C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 ΔA 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°C下, 每毫克组织蛋白每分钟产生 1 nmol NADPH 为一个酶活单位。

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

2、按样本鲜重计算

酶活定义: 在 37°C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°C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, 2×10^{-4} L;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

T---反应时间, 3min;

W---样本质量, g;

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 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。