

## 顺乌头酸酶 (Aconitase) 活性试剂盒说明书

(货号: G0872F 紫外法 48 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 60mL×1 瓶	-20°C保存	
试剂二	液体 15mL×1 瓶	-20°C保存	
试剂三	液体 0.5mL×1 瓶	-20°C保存	
试剂四	液体 35mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	A: 粉体 mg×1 支 B: 粉体 mg×1 支	4°C保存	临用前分别加 0.25mL 蒸馏水于 A 和 B 中, 使其完全溶解, 4°C保存一个月。
试剂六	液体 $\mu\text{L}$ ×1 支	-20°C保存	临用前甩几下使液体落入底部, 再加 0.95mL 蒸馏水混匀, 可分装保存。
试剂七	粉体 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 34mL 试剂四溶解, 4°C保存。
试剂八	粉体 mg×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, 4°C保存。

### 三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、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 $\mu\text{L}$  试剂二和 2 $\mu\text{L}$  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 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 $\mu\text{L}$  至新 EP 管中, 加入 5 $\mu\text{L}$  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 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。
- ③ 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	60
试剂六	20
试剂七	640
混匀, 37°C条件下, 孵育 5min	
试剂八	20
混匀, 37°C条件下, 立即于 340nm 处读取 A1, 3min 后读取 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

## 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。

$$\text{顺乌头酸酶}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 661 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

### 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。

$$\text{顺乌头酸酶}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 140.1 \times \Delta A \div W$$

### 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。

$$\text{顺乌头酸酶}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.28 \times \Delta A$$

V1---加入样本体积, 0.06mL;

V---加入提取液体积, 0.212 mL;

V2---反应体系总体积,  $7.4 \times 10^{-4}$  L;

d---光径, 1cm;

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。