

顺乌头酸酶（Aconitase）活性试剂盒说明书

（货号：BP10408W 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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 支	-20℃ 避光保存	
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	A: 粉体 1 支 B: 粉体 1 支	4℃ 保存	1. 临用前分别加 0.5mL 蒸馏水于 A 和 B 中, 使其完全溶解; 2. 4℃ 保存一个月。
		-20℃ 避光保存	
试剂六	液体 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4℃ 离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 1.026mL 蒸馏水混匀, 可分装保存; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂七	粉体 1 瓶	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 17.5mL 试剂四溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂八	粉体 1 支	4℃ 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材：

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定：

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 组织样本：

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。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。在沉淀(线粒体)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 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液体样本：澄清的液体直接检测；若浑浊则离心后取上清检测。

③细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；4℃×12000g 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：试剂一（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100μL至新EP管中，加入5μL的**激活剂**，置于冰上孵育1小时，若浑浊则4℃×12000g离心5min后取上清液作为样本直接检测。

3、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），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：

试剂组分（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 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。

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

2、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。

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

3、按液体体积计算：

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

顺乌头酸酶活性(nmol/min/mL) $[\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 1071.8 \times \Delta A$

4、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。

顺乌头酸酶活性（nmol/min/10⁴ 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。
500---细菌或细胞总数, 万。