

顺乌头酸酶(ACO)活性检测试剂盒(微量法)

产品货号: BA1881

产品规格: 100管/96样

产品简介:

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。

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。

注意: 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成:

试剂一: 100mL×1瓶, -20℃保存;

试剂二: 20mL×1瓶, -20℃保存;

试剂三: 1.5mL×1支, -20℃保存;

试剂四: 液体20mL×1瓶, 4℃保存;

试剂五: 液体5mL×1瓶, 4℃保存;

试剂六: 粉剂×1支, -20℃保存; 临用前加1.5mL蒸馏水充分溶解; 现配现用

试剂七: 粉剂×1支, 4℃保存; 临用前加12mL试剂四充分溶解;

工作液: 临用前在12mL试剂七中加入1mL蒸馏水、1mL试剂四、1mL试剂五、1mL试剂六充分混匀。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

样本的前处理:

1. 组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离;
2. 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。
3. 将匀浆转入离心管内600g, 4℃离心5min。
4. 弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4℃离心10min。
5. 上清液即胞浆提取物, 可用于测定胞质顺乌头酸酶活性。
6. 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. 分光光度计或酶标仪预热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℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)水浴10min; 现配现用; 若分次用将工作液分装后于-20℃保存, 一星期内可用。
(2)在微量石英比色皿或96孔板中加入40 μ L样本160 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 $\Delta A=A_2-A_1$ 。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

ACO活性计算:

a.用微量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1nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$\text{ACO活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 268 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2)按样本鲜重计算

单位的定义: 每g组织每分钟生成1nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$\text{ACO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 54 \times \Delta A \div W$$

(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1nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$\text{ACO活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.108 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积, $2 \times 10^{-4}\text{L}$; ϵ : NADH摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3\text{L}/\text{mol}/\text{cm}$; d: 比色皿光径, 1cm; V样: 加入样本体积, 0.04mL; V样总: 加入提取液体积, 0.202mL; 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。

b.用96孔板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1nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$\text{ACO活性}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 536 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2)按样本鲜重计算

单位的定义: 每g组织每分钟生成 1nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$\text{ACO}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 108 \times \Delta A \div W$$

(3)按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每1万个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成1nmol的NADH定义为一个酶活性单位。

$$\text{ACO活性}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.216 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积, $2 \times 10^{-4}\text{L}$; ϵ : NADH摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3\text{L}/\text{mol}/\text{cm}$; d: 96孔板光径, 0.5cm; V样: 加入样本体积, 0.04mL; V样总: 加入提取液体积, 0.202mL; 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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>