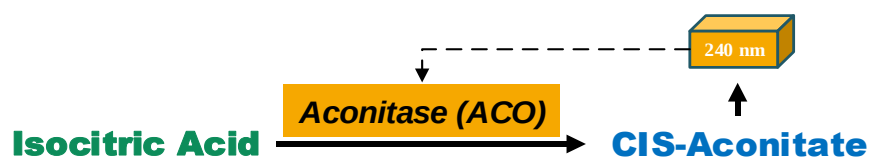




顺乌头酸酶（ACO）活性检测试剂盒

Aconitase (ACO) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



顺乌头酸酶（ACO）活性检测试剂盒

Aconitase (ACO) Activity Assay Kit

一、产品描述

顺乌头酸酶（Aconitase）又称乌头酸水合酶，作为胞浆与线粒体中重要的铁硫蛋白酶，能够催化顺乌头酸生成柠檬酸或异柠檬酸的立体专一性的可逆反应，对维持三羧酸循环及乙醛酸循环的顺利进行起着重要作用。

顺乌头酸酶能够催化异柠檬酸生成顺乌头酸，顺乌头酸在 240 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值的变化即可表征顺乌头酸酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 120 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂二	液体 50 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂三	液体 600 μL×3 支	-20°C保存	易挥发组分 (使用后及时密封置于-20°C保存)
试剂四	液体 25 mL×1 瓶	4°C保存	-

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿（光径 10 mm）/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 顺乌头酸酶的提取（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

1.1 总顺乌头酸酶的提取

称取 0.1 g 组织或收集 500 万细胞或细菌，加入 1 mL 试剂一与 10 μL 试剂三，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 3 s，间隔 9 s，重复 15 次），4°C 11000 g 离心 15 min，取上清置于冰上，可用于测定总顺乌头酸酶的活性（建议蒸馏水稀释 5-10 倍后再进行测定）。

1.2 胞浆与线粒体顺乌头酸酶的提取

①称取约 0.2 g 组织或收集 1000 万细胞，加入 1 mL 试剂一和 10 μL 试剂三，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，匀浆液 4°C 600 g 离心 5 min，弃沉淀，留上清；

②将匀浆液离心上清液移至另一离心管中，4℃ 11000 g 离心 15 min；

③步骤②离心后上清液即胞浆提取物，胞浆中顺乌头酸酶活性（建议蒸馏水稀释 5-10 倍后再进行测定）；

④步骤②离心后沉淀中加入 400 μL 试剂二和 4 μL 试剂三，冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 3 s，间隔 9 s，重复 15 次），4℃ 5000 g 离心 2 min，取上清置于冰上待测，用于测定线粒体中顺乌头酸酶活性（建议蒸馏水稀释 5-10 倍后再进行测定）。

注：根据实验要求选择性提取总顺乌头酸酶、胞浆乌头酸酶或线粒体乌头酸酶。

2.测定步骤

①紫外分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 240 nm，蒸馏水调零。

②试验前将试剂四 25℃预热 15 min 以上。

③在微量石英比色皿或 96 孔 UV 板中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)
试剂四	180
待测样本	20

吸光值测定：①加入待测样本的同时开始计时，测定 10 s（总时间）时 240 nm 处吸光值，记为 A1；②25℃准确反应 300 s，测定 310 s（总时间）时 240 nm 处吸光值，记为 A2；③计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

3.顺乌头酸酶（ACO）活性计算

3.1 使用微量石英比色皿测定的计算公式

（1）总顺乌头酸酶活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 顺乌头酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times D \times 10^6}{\epsilon \times d_1 \times \text{CprA} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{555.6 \times \Delta A \times D}{\text{CprA}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol 顺乌头酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times D \times 10^6}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{561.1 \times \Delta A \times D}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 顺乌头酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times D \times 10^6}{\epsilon \times d_1 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{561.1 \times \Delta A \times D}{\text{细菌或细胞数量}}$$

注释： V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.02 mL；V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：顺乌头酸消光系数，3.6 L/mmol/cm； d_1 ：微量石英比色皿光径，1 cm；V 提：待测样本总体积，1.01 mL；W：样本质量，g；CprA：样本蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，5 min； 10^6 ：单位换算系数，1 mmol= 1×10^6 nmol；D：待测样本稀释倍数。

(2) 胞浆顺乌头酸酶活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 顺乌头酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times D \times 10^6}{\epsilon \times d_1 \times \text{CprB} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{555.6 \times \Delta A \times D}{\text{CprB}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol 顺乌头酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times D \times 10^6}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{561.1 \times \Delta A \times D}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 顺乌头酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times D \times 10^6}{\epsilon \times d_1 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{561.1 \times \Delta A \times D}{\text{细菌或细胞数量}}$$

注释： V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.02 mL；V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：顺乌头酸消光系数，3.6 L/mmol/cm； d_1 ：微量石英比色皿光径，1 cm；V 提：胞浆样本总体积，1.01 mL；W：样本质量，g；CprB：样本蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，5 min； 10^6 ：单位换算系数，1 mmol= 1×10^6 nmol；D：待测样本稀释倍数。

(3) 线粒体顺乌头酸酶活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 顺乌头酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times D \times 10^6}{\epsilon \times d_1 \times \text{CprB} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{555.6 \times \Delta A \times D}{\text{CprB}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol 顺乌头酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times D \times 10^6}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{244.4 \times \Delta A \times D}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol 顺乌头酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}} \times D \times 10^6}{\epsilon \times d_1 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{244.4 \times \Delta A \times D}{\text{细菌或细胞数量}}$$

注释： V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.02 mL；V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：顺乌头酸消光系数，3.6 L/mmol/cm； d_1 ：微量石英比色皿光径，1 cm；V 提：线粒体样本总体积，0.404 mL；W：样本质量，g；CprB：样本蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，5 min； 10^6 ：单位换算系数，1 mmol= 1×10^6 nmol；D：待测样本稀释倍数。

3.2 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

将上述公式中微量石英比色皿光径 ($d_1=1$ cm) 改为 96 孔 UV 板光径 ($d_2=0.5$ cm) 进行计算即可；

四、注意事项

- ①若测定吸光值大于1.0时，建议将待测样本适当稀释后再进行测定；若 ΔA 小于0.01，可适当延长反应时间后再进行测定，计算时相应修改；
- ②由于试剂一中含有1 mg/mL蛋白，测定样本蛋白浓度时需要扣除试剂一自身的蛋白含量；
- ③准确在相应时间点完成吸光值测定，以确保试验结果的准确性和重复性；若使用96孔UV板测定，需使用多道移液器且分批进行测定，以确保组间反应时间一致；
- ④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

Note:

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

