

# 顺乌头酸酶(ACO)检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1119

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织、细胞、真菌、细菌

## 产品简介

顺乌头酸酶(Aconitase, ACO; EC 4.2.1.3)，一种含 Fe-S 簇的酶，在三羧酸循环中，催化从柠檬酸经顺乌头酸生成异柠檬酸的可逆性异构化，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。真核细胞中 ACO 主要存在于胞浆与线粒体中，细菌中也含有 ACO。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。本试剂盒提供了一种简单、方便、快速的 ACO 活性检测方法，其原理是 ACO 催化柠檬酸转化成异柠檬酸，异柠檬酸氧化脱羧将 NAD<sup>+</sup>还原生成 NADH，导致 340nm 处光吸收上升，根据 NADH 的生成速率可计算获得顺乌头酸酶的活性。

## 产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	50mL	100mL	4℃ 保存
试剂二	10mL	20mL	4℃ 保存
试剂三	1mL	2mL	-20℃ 避光保存
试剂四	10mL	20mL	4℃ 保存
试剂五	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃ 避光保存
试剂六	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20℃ 避光保存
试剂七	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃ 避光保存

## 自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计（能测 340nm 处的吸光度）  
 96 孔 UV 板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头  
 水浴锅、制冰机，低温离心机  
 去离子水  
 匀浆器（如果是组织样本）

## 试剂准备

**注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。**

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；-20℃ 避光保存。

试剂四：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂五：临用前配制，对于 48T，加入 2.5mL 去离子水；96T 加入 5mL 去离子水。充分混匀待用；未用完的试剂分装 -20℃ 避光保存，避免反复冻融。

试剂六：临用前配制，对于 48T，加入 0.75mL 去离子水；96T 加入 1.5mL 去离子水，充分溶解待用；不完试剂分装后 -20℃ 保存，避免反复冻融。

## 产品说明书

试剂七：临用前配制，对于 48T，加入 6mL 试剂四；96T 加入 12mL 试剂四，充分溶解待用；用不完的试剂 4℃ 避光保存。

工作液：现配现用，对于 48 T，在 6 mL 试剂七中加入 0.5 mL 去离子水、0.5 mL 试剂四、0.5 mL 试剂五、0.5 mL 试剂六；对于 96 T，在 12 mL 试剂七中加入 1 mL 去离子水、1 mL 试剂四、1 mL 试剂五、1 mL 试剂六，充分混匀待用。未用完的试剂-20℃ 避光保存，可保存一周。

### 样本制备

#### 1. 细菌样本：

收集 500 万个细菌，加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂三，冰浴超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。11,000g，4℃ 离心 10min，取上清液置冰上检测。

#### 2. 真菌中胞浆蛋白与线粒体蛋白的提取：

1) 收集 500 万个真菌，加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂三，冰浴超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次）。600g，4℃ 离心 5min，收集上清液至另一新的离心管中，舍弃沉淀。

2) 再次离心上清，11,000g，4℃ 离心 10min，沉淀即为提取的线粒体。

3) 上清液即为胞浆提取物，可用于测定**胞质顺乌头酸酶活性**。

4) 在沉淀中加入 200μL 试剂二和 2μL 试剂三，充分重悬沉淀，用于**线粒体顺乌头酸酶活性测定**。

#### 3. 组织和细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的提取：

1) 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万个细胞，加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂三，冰浴匀浆；

2) 离心匀浆液，600g，4℃ 离心 5min，收集上清液至另一新的离心管中，舍弃沉淀；

3) 再次离心上清，11,000g，4℃ 离心 10min，沉淀即为提取的线粒体；

4) 上清液即为胞浆提取物，可用于测定**胞质顺乌头酸酶活性**。

5) 在沉淀中加入 200μL 试剂二和 2μL 试剂三，充分重悬沉淀，用于**线粒体顺乌头酸酶活性测定**。

**注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃ 保存 1 个月。测定过程中样本和所有试剂在冰上放置，以免变性和失活。**

### 实验步骤

1. 酶标仪或紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 340nm。紫外分光光度计去离子水调零。

2. 工作液于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 10min。

3. 在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入 40μL 样本和 160 μL 工作液，迅速混匀后于 340nm 检测，记录 20s 和 3min20s 的吸光值，分别记为  $A_1$  和  $A_2$ ，计算  $\Delta A=A_2-A_1$ 。

**注意：1. 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  $\Delta A$  小于 0.001 可适当加大提取样本量；如果  $\Delta A$  大于 0.5，可用试剂二稀释样品，计算时结果乘以稀释倍数。**

**2. 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）。**

**3. 因通过反应速率计算酶活，使用 96 孔 UV 板时请根据操作速度控制一次测定的样本数（通常一次测定 4-8 个样本），不推荐同时测多个样本。**

### 结果计算

#### A. 使用 96 孔板测定的计算公式

##### 1. 按细菌数量计算：

单位的定义：每 1 万个细菌在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO 活性 (U/10}^4 \text{ cells)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times 500) \div T = 1.08 \times \Delta A$$

##### 2. 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO 上清活性 (U/g 鲜重)} = [\Delta A_{\text{上清}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times W) \div T = 541 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W$$

$$\text{ACO 沉淀活性 (U/g 鲜重)} = [\Delta A_{\text{沉淀}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 108 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W$$

$$\text{总 ACO 活性 (U/g 鲜重)} = \text{ACO 上清活性} + \text{ACO 沉淀活性} = 541 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W + 108 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W$$

##### 3. 按细胞或真菌数量计算：

单位的定义：每 1 万个细胞或真菌在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO 上清活性 (U/10}^4 \text{ cells)} = [\Delta A_{\text{上清}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times 500) \div T = 1.08 \times \Delta A_{\text{上清}}$$

$$\text{ACO 沉淀活性 (U/10}^4 \text{ cells)} = [\Delta A_{\text{沉淀}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 0.217 \times \Delta A_{\text{沉淀}}$$

$$\text{总 ACO 活性 (U/10}^4 \text{ cells)} = \text{ACO 上清活性} + \text{ACO 沉淀活性} = 1.08 \times \Delta A_{\text{上清}} + 0.217 \times \Delta A_{\text{沉淀}}$$

## 产品说明书

$V_{\text{反应}}$ : 反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4} \text{L}$ ;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{mol/L/cm}$ ;  $d$ : 0.5cm;  $10^9$ :  $1 \text{mol} = 1 \times 10^9 \text{nmol}$ ;  $V_{\text{样}}$ : 加入样本体积, 0.04 mL;  $T$ : 反应时间, 3min;  $\Delta A_{\text{上清}}$ : 上清测定值;  $V_{\text{提取}}$ : 加入提取液体积, 1.01 mL;  $W$ : 样品质量, g;  $\Delta A_{\text{沉淀}}$ : 沉淀测定值;  $V_{\text{样总}}$ : 加入试剂二和试剂三的总体积, 0.202mL; 500: 细胞总数, 500 万。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径  $d: 0.5\text{cm}$  调整为  $d: 1\text{cm}$  进行计算即可。

### 注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

### 相关产品：

PMK1005 柠檬酸合酶(CS)检测试剂盒(微量法)

PMK1109 琥珀酸脱氢酶(SDH)检测试剂盒(微量法)

PMK1114 线粒体苹果酸脱氢酶(MDHm)检测试剂盒(微量法)

PMK1115 乳酸(LA)检测试剂盒(微量法)

PMK1116 丙酮酸(PA)检测试剂盒(微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

