

顺乌头酸酶（ACO）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC10709

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
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 0.6 mL×3 支	-20°C保存
试剂四	液体 25 mL×1 瓶	4°C保存
试剂五	粉剂×1 支	4°C保存
试剂六	粉剂×1 支	4°C保存

溶液的配制：

试剂三：易挥发试剂，使用后尽快拧紧盖子放入-20°C保存。

产品说明：

顺乌头酸酶（Aconitase, ACO）是细胞内一种重要的铁硫蛋白酶，主要存在于胞浆与线粒体中。ACO 催化细胞内柠檬酸经中间产物顺乌头酸生成异柠檬酸的可逆反应，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。

顺乌头酸酶催化异柠檬酸生成顺乌头酸，顺乌头酸在 240nm 有特征吸收峰，通过检测顺乌头酸的产生速率来计算该酶活性。

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。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度/酶标仪、低温台式离心机、水浴锅/恒温培养箱、超声波细胞破碎仪、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、顺乌头酸酶的提取：（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

A、总顺乌头酸酶的提取：

称取约 0.1g 组织或收集 500 万个细胞（细菌），加入 1mL 试剂一与 10 μ L 试剂三，用匀浆器或研钵于冰上匀浆。将匀浆置于冰上超声波破碎（功率 40%，超声 3 秒，间隔 9 秒，重复 15 次），4°C，11000 \times g 离心 15min，取上清置于冰上待测（若以蛋白浓度计算，则需留出足够量来测定蛋白浓度 Cpr1）。用于测定总顺乌头酸酶活性（建议将样本用蒸馏水稀释 4-10 倍后检测）。

B、胞浆与线粒体中顺乌头酸酶的提取：

- (1) 称取约 0.2 g 组织或收集 1000 万个细胞，加入 1mL 试剂一与 10 μ L 试剂三，用匀浆器或研钵于冰上匀浆。
- (2) 4°C，600 \times g 离心 5min。（若以蛋白浓度计算，则需留出足够量来测定蛋白浓度 Cpr2）。

- (3) 将上清液移至另一离心管中，4°C，11000×g 离心 15min。
- (4) 上清液即胞浆提取物，用于**测定胞浆中的顺乌头酸酶活性**（建议将样本用蒸馏水稀释 4-10 倍后检测）。
- (5) 在沉淀中加入 400μL 试剂二与 4μL 试剂三，置于冰上超声波破碎（功率 40%，超声 3 秒，间隔 9 秒，重复 15 次），4°C，5000×g 离心 2min，取上清置于冰上待测。用于**测定线粒体中顺乌头酸酶活性**（建议将样本用蒸馏水稀释 4-10 倍后检测）。

注意：根据实验需要选择性提取细胞总顺乌头酸酶、胞浆乌头酸酶或线粒体乌头酸酶。

二、测定步骤

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热30min 以上，调节波长至240nm，蒸馏水调零。
2. 样本测定
 - (1) 工作液的配制：临用前将试剂五和试剂六加入到试剂四中，充分溶解待用，用不完的试剂 4°C避光保存；
 - (2) 将工作液 25°C预热 15min 以上；
 - (3) 在微量石英比色皿/96 孔 UV 板中分别加入：

试剂名称 (μL)	测定管
工作液	180
样本	20
加入样本即开始计时，立即混匀，于 240nm 处测定 10s 时的吸光值 A1，迅速置于 25°C 水浴锅或恒温培养箱中准确反应 5min（酶标仪有控温功能的可以将温度调至 25°C），迅速取出比色皿或 96 孔 UV 板并擦干，记录 5min 时的吸光度 A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

三、顺乌头酸酶活性的计算

A、按微量石英比色皿计算：

1、总顺乌头酸酶活性计算：

- (1) 按样本蛋白浓度计算

酶活定义：每 mg 组织蛋白每分钟净生产 1nmol 顺乌头酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO 酶活(U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr1}) \div T \times N = 555.55 \times \Delta A \div \text{Cpr1} \times N$$

- (2) 按样本质量计算

酶活定义：每 g 组织在反应体系中每分钟净生产 1nmol 顺乌头酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO 酶活(U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times W) \div T \times N = 561.11 \times \Delta A \div W \times N$$

- (3) 按照细菌或细胞数量计算

酶活定义：每 10⁴ 个细菌或细胞在反应体系中每分钟净生产 1nmol 顺乌头酸定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACO 酶活(U/10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T \times N \\ &= 561.11 \times \Delta A \div \text{细胞数量 (万个)} \times N \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴L；ε：顺乌头酸消光系数，3.6 L/mmol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.02mL；V 提取：样本总体积，1.01mL；T：反应时间，5min；Cpr1：样本蛋白质浓度，mg/mL；10⁶ 单位换算系数，1mmol=1×10⁶nmol；N：稀释倍数。

2、胞浆顺乌头酸酶活性计算：

- (1) 按样本蛋白浓度计算

酶活定义：每 mg 组织蛋白每分钟净生产 1nmol 顺乌头酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO 酶活(U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr2}) \div T \times N = 555.55 \times \Delta A \div \text{Cpr2} \times N$$

(2) 按样本质量计算

酶活定义：每 g 组织在反应体系中每分钟净生产 1nmol 顺乌头酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO 酶活(U/g 质量)}=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times W) \div T \times N = 561.11 \times \Delta A \div W \times N$$

(3) 按照细菌或细胞数量计算

酶活定义：每 10⁴ 个细菌或细胞在反应体系中每分钟净生产 1nmol 顺乌头酸定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACO 酶活(U/10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T \times N \\ &= 561.11 \times \Delta A \div \text{细胞数量 (万个)} \times N \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴L；ε：顺乌头酸消光系数，3.6L/mmol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.02mL；V 提取：胞浆样本总体积，1.01mL；T：反应时间，5min；Cpr2：样本蛋白质浓度，mg/mL；10⁶：单位换算系数，1mmol=1×10⁶nmol；N：稀释倍数。

3、线粒体顺乌头酸酶活性计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算

酶活定义：每 mg 组织蛋白每分钟净生产 1nmol 顺乌头酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO 酶活(U/mg prot)}=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr2}) \div T \times N = 555.55 \times \Delta A \div \text{Cpr2} \times N$$

(2) 按样本质量计算

酶活定义：每 g 组织在反应体系中每分钟净生产 1nmol 顺乌头酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO 酶活 (U/g 质量)}=[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \times N = 244.44 \times \Delta A \div W \times N$$

(3) 按照细菌或细胞数量计算

酶活定义：每 10⁴ 个细菌或细胞在反应体系中每分钟净生产 1 nmol 顺乌头酸定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACO 酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^6] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times \text{细胞数量 (万个)}) \div T \times N \\ &= 244.44 \times \Delta A \div \text{细胞数量 (万个)} \times N \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴L；ε：顺乌头酸消光系数，3.6 L/mmol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.02mL；V 样总：线粒体样本总体积，0.404mL；T：反应时间，5min；Cpr2：样本蛋白质浓度，mg/mL；10⁶：单位换算系数，1mmol=1×10⁶nmol；N：稀释倍数。

B、按 96 孔 UV 板计算：

将上述公式中的 d-1cm 改为 d-0.6cm（96 孔板光径）进行计算即可。

注意事项：

- 1、A 大于 1 时，建议将样本用蒸馏水稀释后再进行测定，并在计算时乘以相应的稀释倍数。
- 2、当 ΔA 小于 0.01 时，可适当延长反应时间，并在计算时将实际反应时间（T）带入计算公式。
- 3、测定蛋白浓度时，由于试剂一本身含有蛋白（约 1 mg/mL）所有测定时需要扣除此部分蛋白。

实验实例：

1. 取 0.1g 画眉草样本，加入 1mL 试剂一与 10μL 试剂三进行总顺乌头酸酶的提取，取上清稀释 4 倍，用微量石英比色皿测得 ΔA=A₂-A₁=0.5693-0.5571=0.0122，按样本质量计算总顺乌头酸酶的酶活得：
ACO 酶活(U/g 质量)=561.11×ΔA÷W×N=273.8217 U/g 质量。

2. 取 0.1g 兔子肾脏样本，加入 1mL 试剂一与 10 μ L 试剂三进行总顺乌头酸酶的提取，取上清稀释 8 倍，用微量石英比色皿测得 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.4520 - 0.4186 = 0.0334$ ，按样本质量计算总顺乌头酸酶的酶活得：
ACO 酶活(U/g 质量) = $561.11 \times \Delta A \div W \times N = 1499.2859$ U/g 质量。