

使用说明书

Instruction Manual

顺乌头酸酶活性检测试剂盒（微量法）

ACO Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

顺乌头酸酶（Aconitase, ACO）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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0014M-A	100mL×1 瓶	-20℃保存。
CB0014M-B	20mL×1 瓶	-20℃保存。
CB0014M-C	1.5mL×1 支	-20℃保存。
CB0014M-D	20mL×1 瓶	4℃保存。
CB0014M-E	5mL×1 瓶	4℃保存。
CB0014M-F	粉剂×1 支	-20℃保存；临用前加 1.5mL 蒸馏水充分溶解，现配现用。
CB0014M-G	粉剂×1 支	4℃保存；临用前加 12mL CB0014M-D 充分溶解。
工作液配制：临用前在 12mL CB0014M-G 中加入 1mL 蒸馏水、1mL CB0014M-D、1mL CB0014M-E、1mL CB0014M-F 充分混匀。		

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品：

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。

二、样本的前处理：

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

- 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1mL CB0014M-A 和 10 μ L CB0014M-C，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 将匀浆转入离心管内 600g，4℃ 离心 5min。
- 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃ 离心 10min。
- 上清液即胞浆提取物，可用于测定胞质顺乌头酸酶活性。
- 在步骤 4 的沉淀中加入 200 μ L CB0014M-B 和 2 μ L CB0014M-C，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。

三、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°C（哺乳动物）或 25°C（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 40μL 样本和 160μL 工作液，混匀，立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 3min 20s 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

四、ACO 酶活性计算：

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 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活性单位。
$$\text{ACO 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V \text{ 样}) \div T = 268 \times \Delta A \div Cpr$$
2. 按样本鲜重计算
单位的定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活性单位。
$$\text{ACO (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 54 \times \Delta A \div W$$
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 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活性单位。
$$\text{ACO 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.108 \times \Delta A$$

注：V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.04 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；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
单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活性单位。
$$\text{ACO 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 536 \times \Delta A \div Cpr$$
2. 按样本鲜重计算
单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活性单位。
$$\text{ACO (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 108 \times \Delta A \div W$$
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 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活性单位。
$$\text{ACO 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.216 \times \Delta A$$

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

注意事项

1. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
2. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

