（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

产品货号：E-BC-K656-M

产品规格：48T(48 samples)/96T(96 samples)

检测仪器：酶标仪(230-250 nm)

Elabscience®顺乌头酸酶(ACO)比色法测试盒

Aconitase (ACO) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织样本中顺乌头酸酶（ACO）的活力。

检测原理

顺乌头酸酶(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 240 nm 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。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 A (Extraction Solution A)	50 mL×1 瓶	50 mL×2 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	提取液 B (Extraction Solution B)	25 mL×1 瓶	50 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	蛋白酶抑制剂 (Protease Inhibitor)	0.7 mL×1 支	1.4 mL×1 支	-20°C 避光保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	缓冲液 (Buffer Solution)	15 mL×1 瓶	30 mL×1 瓶	-20°C 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	底物 (Substrate)	0.15 mL×2 支	0.15 mL×4 支	-20°C 避光保存 6 个月
	96 孔 UV 酶标板	96 孔×1 块		无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(230-250 nm，最佳检测波长 240 nm)

试剂：生理盐水(0.9% NaCl)或 PBS(0.01 M，pH 7.4)

试剂准备

检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

样本准备

① 样本处理

组织样本：

1) 取0.1 g 组织样本加入0.9 mL试剂一与0.01 mL的试剂三匀浆，600 × g，4°C离心5 min，取上清弃沉淀。
2) 上清液15000 × g ，4°C 离心10 min，将上清液移至另一离心管中。
3) 上清液即胞浆提取物，用于测定胞浆中的顺乌头酸酶活性，留取部分上清进行胞浆蛋白浓度测定。
4) 取沉淀，沉淀加入200 μL试剂二与2 μL试剂三混匀，超声3 min， 15000 × g，4°C离心10 min，弃沉淀取上清待测，用于测定线粒体中顺乌头酸酶活性。留取部分上清进行线粒体蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：2.32-60.19 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠肝组织	6-10	10%小鼠肾组织	4-6
10%小鼠肝组织	6-10	10%小鼠脑组织	4-6
10%大鼠肺组织	6-10	10%小鼠肌肉组织	2-4

注：稀释液为试剂二。

实验关键点

① 加入试剂 4 时需触壁缓慢加入，避免产生气泡。

② 建议每次实验样本数控制在 10 个以内。

③ 尽量使用新鲜样本进行测定，样本极易失活，处理好的样本尽量放置在冰盒上，建议在 2 个小时内用完。

④ 试剂五易被氧化，每次使用完后要及时盖上盖子。

操作步骤

① 样本的孵育：按待测上清样本：试剂五体积比=80：1 混匀（试剂五的加入体积建议在 10 μL 以上），37℃孵育 10 min 后取出，置于冰盒上待用。

② 测定孔：向酶标板相应孔中加入待测样本 20 μL，试剂四 180 μL。

③ 振板 3 s，酶标仪于 240 nm 处测定各孔的 OD 值 A_1，25°C 孵育 4 min，测定各孔的 OD 值 A_2，$\Delta A = A_2 - A_1$。

操作表

样本的孵育：按待测上清样本：试剂五体积比=80：1 混匀（试剂五的加入体积建议在 10 μL 以上），37 ℃孵育 10 min 后取出，置于冰盒上待用	
	测定孔
待测样本(μL)	20
试剂四(μL)	180
振板 3 s，酶标仪于 240 nm 处测定各孔的 OD 值 A_1，25°C 孵育 4 min，测定各孔的 OD 值 A_2，$\Delta A=A_2-A_1$。	

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

组织样本中顺乌头酸酶(ACO)酶活计算公式：

定义：室温条件下，每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol 顺乌头酸定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO 酶活 (U/mgprot)} = \frac{\Delta A}{3.6 \times 0.6} \times 0.0002 \div T \div 0.02 \div C_{pr} \times f \times 10^6$$

注解：

ΔA：测定孔变化 OD 值(A_2-A_1)

3.6：摩尔吸光系数，L/mmol/cm

0.6：光径，cm

0.0002：反应体系的总体积，L

T：反应时间，4 min

0.02：加入样本的体积，mL

C_{pr}：样本蛋白浓度，mgprot/mL

f：样本加入检测体系之前的稀释倍数

10^6：1 mmol = 1×10^6 nmol

附录1 关键数据

1. 技术参数

检测范围	2.32-60.19 U/L	**平均批间差**	9.5 %
灵敏度	2.32 U/L	**平均批内差**	5.9 %
平均回收率	103 %		

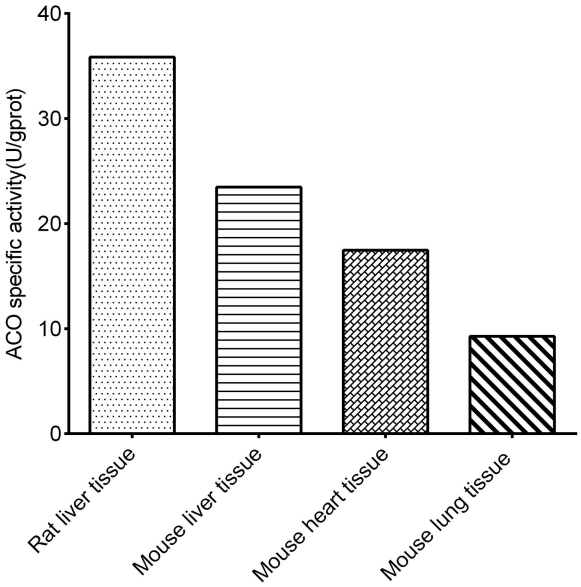
附录2 实例分析

例如检测5%大鼠肝组织样本：(数据仅供参考)：

制备的5%大鼠肝组织线粒体上清液用试剂二稀释4倍，取稀释后的样本20 μL，按操作表操作，结果如下：初始OD值A_1为0.476，4 min时的OD值A_2为0.546，$\Delta A = A_2 - A_1 = 0.546 - 0.476 = 0.07$；5%大鼠肝组织线粒体样本的蛋白浓度为9.04 mgprot/L，计算结果为：

$$\text{ACO 酶活 (U/mgprot)} = \frac{0.07 \times 0.0002 \times 4}{3.6 \times 0.6 \times 0.02 \times 9.04 \times 4} \times 10^6 = 35.85 \text{ U/mgprot}$$

按说明书操作，测定大鼠肝组织(5%线粒体匀浆蛋白浓度为9.04 mgprot/L，稀释4倍，加样量20 μL)、小鼠肝组织(5%线粒体匀浆蛋白浓度为9.07 mgprot/L，稀释4倍，加样量20 μL)、小鼠心组织(5%线粒体匀浆蛋白浓度为4.24 mgprot/L，稀释4倍，加样量20 μL)、小鼠肺组织(5%线粒体匀浆蛋白浓度为4.31 mgprot/L，稀释2倍，加样量20 μL)中的顺乌头酸酶活力(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差异大	测定 OD 值时,酶标板孔中有气泡	用移液枪将气泡消去
样本测不出值	样本浓度低或者稀释倍数较大	增加样本的浓度
	样本保存时间过长或者保存不当	取新鲜样本，重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。