

(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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	底物 (Substrate)	0.15 mL×2 支	0.15 mL×4 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔 UV 酶标板	1 板		
	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℃ 离心5 min，取上清弃沉淀。
- 2) 上清液15000 ×g，4℃ 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℃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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 %		

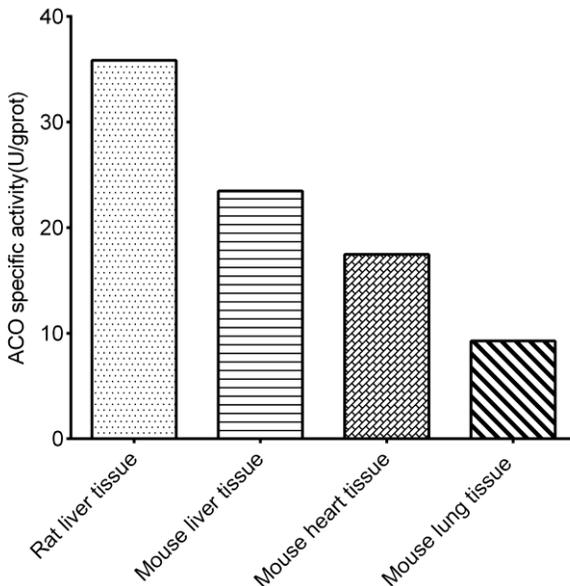
附录2 实例分析

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。

