

顺乌头酸酶（ACO）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC4485

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 120 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 0.6 mL×3 支	-20℃保存
试剂四	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存

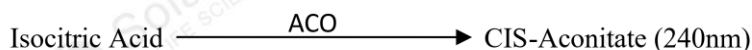
溶液的配制：

- 1、试剂三：易挥发试剂，使用后尽快拧紧盖子，密封后放入-20℃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。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/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 10μL 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 300W，超声 3 秒，间隔 9 秒，重复 15 次），4℃，11000×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 10μL 试剂三，用匀浆器或研钵于冰上匀浆。
- (2) 4℃，600×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℃，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 400 μ L 试剂二与 4 μ L 试剂三，置于冰上超声波破碎（功 300W，超声 3 秒，间隔 9 秒，重复 15 次），4 $^{\circ}$ C，5000 $\times$ 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，分光光度计用蒸馏水调零。

2. 样本测定

(1) 将试剂四 25 $^{\circ}$ C 预热 15min 以上；

(2) 在微量石英比色皿/96 孔 UV 板中分别加入：

试剂名称 (μ L)	测定管
试剂四	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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C），迅速取出微量石英比色皿/96 孔 UV 板，测定 5min10s 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 10^4 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 $\times 10^{-4}$ L； ϵ ：顺乌头酸消光系数，3.6 L/mmol/cm；d：微量石英比色皿光径，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； 10^6 ：单位换算系数，1mmol=1 $\times 10^6$ nmol；N：稀释倍数；W：样本质量，g。

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 10^4 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。



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

$$= 561.11 \times \Delta A \div \text{细胞数量 (万个)} \times N$$

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : 顺乌头酸消光系数, 3.6 L/mmol/cm; d: 微量石英比色皿光径, 1 cm;

V 样: 加入样本体积, 0.02 mL; V 提取: 胞浆样本总体积, 1.01 mL; T: 反应时间, 5 min; Cpr2: 样本蛋白质浓度, mg/mL; 10^6 : 单位换算系数, 1 mmol = 1×10^6 nmol; N: 稀释倍数; W: 样本质量, g。

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 1 nmol 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 1 nmol 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 10^4 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。

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

$$= 244.44 \times \Delta A \div \text{细胞数量 (万个)} \times N$$

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : 顺乌头酸消光系数, 3.6 L/mmol/cm; d: 微量石英比色皿光径, 1 cm;

V 样: 加入样本体积, 0.02 mL; V 样总: 线粒体样本总体积, 0.404 mL; T: 反应时间, 5 min; Cpr2: 样本蛋白质浓度, mg/mL; 10^6 : 单位换算系数, 1 mmol = 1×10^6 nmol; N: 稀释倍数; W: 样本质量, g。

B、按 96 孔 UV 板计算:

将上述公式中的 d-1cm 改为 d-0.6cm (96 孔 UV 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 10 μ L 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 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.5693 - 0.5571 = 0.0122$, 按样本质量计算总顺乌头酸酶的酶活得:
 $\text{ACO 酶活(U/g 质量)} = 561.11 \times \Delta A \div W \times N = 273.8217 \text{ U/g 质量}。$
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:
 $\text{ACO 酶活(U/g 质量)} = 561.11 \times \Delta A \div W \times N = 1499.2859 \text{ U/g 质量}。$

相关发表文献:

- [1] Liu B, Wang W, Shah A, Yu M, Liu Y, He L, Dang J, Yang L, Yan M, Ying Y, Tang Z, Liu K. Sodium iodate induces ferroptosis in human retinal pigment epithelium ARPE-19 cells. Cell Death Dis. 2021 Mar 3;12(3):230. doi: 10.1038/s41419-021-03520-2. PMID: 33658488; PMCID: PMC7930128.





- [2] Hou L, Huang C, Wu X, Zhang J, Zhao M. Nitric Oxide Negatively Regulates the Rapid Formation of *Pleurotus ostreatus* Primordia by Inhibiting the Mitochondrial *aco* Gene. *J Fungi (Basel)*. 2022 Oct 8;8(10):1055. doi: 10.3390/jof8101055. PMID: 36294620; PMCID: PMC9605416.
- [3] Ke X, Jiang X, Huang M, Tian X, Chu J. Engineering of succinyl-CoA metabolism in view of succinylation regulation to improve the erythromycin production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2022 Aug;106(13-16):5153-5165. doi: 10.1007/s00253-022-12060-4. Epub 2022 Jul 12. PMID: 35821431.

相关系列产品:

- BC0710/BC0715 α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性检测试剂盒
- BC0950/BC0955 琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性检测试剂盒
- BC0380/BC0385 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒
- BC2160/BC2165 线粒体异柠檬酸脱氢酶活性检测试剂盒

