

CheKine™ 顺乌头酸酶 (ACO) 活性检测试剂盒 (微量法)

货号: KTB1290

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

	适用样本: 动植物组织、细胞、血清 (浆)
	保质期: -20℃, 避光保存 6 个月

01 背景与原理

顺乌头酸酶 (aconitase, ACO) (EC 4.2.1.3), 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, 生成易于脱氢氧化的异柠檬酸, 为进一步的氧化脱羧反应作准备。

本试剂盒检测原理是 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 340 nm 处光吸收上升。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	60×2 mL	4℃
Reagent I	12 mL	24 mL	4℃
Reagent II	0.75 mL	1.5 mL	-20℃, 避光保存
Reagent III	10 mL	20 mL	4℃
Reagent IV	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃, 避光保存
Reagent V	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃, 避光保存
Reagent VI	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃, 避光保存

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 340 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	UV 板
试剂	去离子水	试剂配制用
其他	匀浆器（组织样本）、制冰机、水浴锅、低温离心机、 可调式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有 助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。若样本放置时间较久或操作习惯的影响等，导致上清中含量较多，则必须检测上清。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询 本公司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴 实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 保存
Reagent I	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 保存
Reagent II	即用型；使用前平衡到室温	-20℃ 避光保存； Reagent II 有毒且有刺激性气味，建议在通风橱进行实验
Reagent III	即用型；使用前平衡到室温	4℃ 保存
Working Reagent IV	临用前配制，对于 48 T，加入 2.5 mL 去离子水，对于 96 T，加入 5 mL 去离子水，充分混匀待用	未用完的试剂-20℃ 避光保存一周，避免反 复冻融
Working Reagent V	临用前配制，对于 48 T，加入 0.75 mL 去离子水，对于 96 T，加入 1.5 mL 去离子水，充分混匀待用	未用完的试剂-20℃ 避光保存一周，避免反 复冻融
Working Reagent VI	临用前配制，对于 48 T，Reagent VI 加入 7.2 mL Reagent III，对于 96 T，Reagent VI 加入 14.4 mL Reagent III，充分混匀待用	未用完的试剂-20℃ 避光保存一周，避免反 复冻融

05-2 样本制备

注意：1. 推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。测定过程中样本和所有试剂在冰上放置，以免变性和失活。

2. 该试剂盒的 Extraction Buffer 与 KTB1270、KTB1280、KTB1240、KTB1230、KTB1250、KTB1023 相同，该试剂盒提取的样本也可以适用于 KTB1270、KTB1280、KTB1240、KTB1230、KTB1250、KTB1023 的测定。

- 血清（浆）样本：直接检测。

- 组织和细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的提取：

(1) 称取约 0.1 g 组织或收集 5×10^6 个细胞，加入 1 mL Extraction Buffer 和 10 μ L Reagent II，冰浴匀浆，600 g，4℃离心 5 min，收集上清至新的离心管中，舍弃沉淀。

(2) 再次离心上清，11000 g，4℃离心 10 min，分别得到上清和沉淀。

(3)（选做）第(2)步的上清液即胞浆提取物，可用于直接测定从线粒体泄漏的 ACO。

(4) 在第(2)步的沉淀中，加入 200 μ L Reagent I 和 2 μ L Reagent II 混匀，用于线粒体 ACO 测定。

05-3 实验步骤

注意：因通过单位时间内吸光值变化计算酶活，不推荐同时测多个样本。

1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 340 nm。

2. Working Solution 的配制：现配现用，对于 48 T，7.2 mL Working Reagent VI 加入 0.6 mL 去离子水、0.6 mL Reagent III、0.6 mL Working Reagent IV、0.6 mL Working Reagent V；对于 96 T，14.4 mL Working Reagent VI 加入 1.2 mL 去离子水、1.2 mL Reagent III、1.2 mL Working Reagent IV、1.2 mL Working Reagent V，充分混匀待用。未用完的试剂-20℃避光保存，可保存一周。测定前，Working Solution 于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 10 min。

3. 检测体系配制：在 96 孔 UV 板中加入 40 μ L 样本和 160 μ L Working Solution。

4. 吸光度检测：迅速混匀，立即测定 340 nm 处吸光值。记录第 20 s 和 3min 20 s 时吸光值，分别记录为 A₁ 和 A₂，上清孔的记为 A_{上清}，沉淀孔的记为 A_{沉淀}。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn) > 进入“技术中心”> 查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ ， $\Delta A_{上清} = A_{2上清} - A_{1上清}$ ， $\Delta A_{沉淀} = A_{2沉淀} - A_{1沉淀}$

2. 样本 ACO 活性计算

- 按样本质量计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

ACO_{上清} 活性(U/g) = $[\Delta A_{上清} \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{样} \div V_{提取} \times W) \div T = 541.26 \times \Delta A_{上清} \div W$

ACO_{沉淀} 活性(U/g) = $[\Delta A_{沉淀} \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{样} \div V_{样总} \times W) \div T = 108.25 \times \Delta A_{沉淀} \div W$

总 ACO 活性(U/g) = ACO_{上清} 活性 + ACO_{沉淀} 活性 = $541.26 \times \Delta A_{上清} \div W + 108.25 \times \Delta A_{沉淀} \div W$

- 按细胞数量计算

单位的定义：每 1 万个细胞在反应体系中每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{ACO}_{\text{上清}} \text{活性}(\text{U}/10^4) &= [\Delta A_{\text{上清}} \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times N) \div T = 541.26 \times \Delta A_{\text{上清}} \div N \\ \text{ACO}_{\text{沉淀}} \text{活性}(\text{U}/10^4) &= [\Delta A_{\text{沉淀}} \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) \div T = 108.25 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div N \\ \text{总 ACO 活性}(\text{U}/10^4) &= \text{ACO}_{\text{上清}} \text{活性} + \text{ACO}_{\text{沉淀}} \text{活性} = 541.26 \times \Delta A_{\text{上清}} \div N + 108.25 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div N \end{aligned}$$

● 按血清（浆）计算

单位的定义：每毫升血清（浆）在反应体系中每分钟生成 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACO 活性}(\text{U}/\text{mL}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 535.90 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 mol/L/cm； 10^9 ：单位换算系数， $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ ； d ：0.5 cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.04 mL； T ：反应时间，3 min； $\Delta A_{\text{上清}}$ ：上清测定值； $V_{\text{提取}}$ ：加入提取液体积，1.01 mL； W ：样品质量，g； $\Delta A_{\text{沉淀}}$ ：沉淀测定值； $V_{\text{样总}}$ ：加入 Reagent I 和 II 的体积，0.202 mL； N ：细胞数量，以 10^4 为单位（例如细胞数量为 5×10^6 ， $N=500$ ）。

07 结果展示

示例 -1：取 0.1 g 玉米粒，按照测定步骤操作，用 96 孔 UV 板进行检测。测得 $\Delta A_{\text{上清}} = A_{2 \text{ 上清}} - A_{1 \text{ 上清}} = 0.414 - 0.401 = 0.013$ ， $\Delta A_{\text{沉淀}} = A_{2 \text{ 沉淀}} - A_{1 \text{ 沉淀}} = 0.318 - 0.314 = 0.004$ ，按样本质量计算得：上清中 ACO 活性 (U/g) = $541.26 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W = 70.364 \text{ U/g}$ ，沉淀中 ACO 活性 (U/g) = $108.25 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W = 4.33 \text{ U/g}$ ，则总 ACO 活性 (U/g) = $541.26 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W + 108.25 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W = 74.694 \text{ U/g}$ 。

08 FAQ

● 检测得到的样本 ΔA 过高怎么办？

若样本吸光值 ΔA 大于 0.5，建议用 Reagent I 进一步稀释，或减少样本量，再重新进行测定。

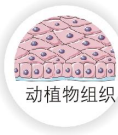
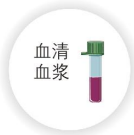
09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1023	CheKine™ 柠檬酸合酶（CS）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1230	CheKine™ 琥珀酸脱氢酶（SDH）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1240	CheKine™ α -酮戊二酸脱氢酶（ α -KGDH）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1270	CheKine™ 丙酮酸脱氢酶（PDH）活性检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 顺乌头酸酶（ACO）活性检测流程示意图

(Abbkin 货号：KTB1290)

样本处理



1 mL Extraction Buffer和10 μ L Reagent II 冰浴匀浆



600 g, 4°C离心5 min, 收集上清至新的离心管中, 舍弃沉淀, 再次离心上清, 11000 g, 4°C离心10 min, 分别得到上清和沉淀

上清, 冰上待测

在沉淀中加入200 μ L Reagent I和2 μ L Reagent II 混匀, 冰上待测

体系配置

Working Solution:

现配现用, 对于48 T, 7.2 mL Working Reagent VI加入0.6 mL去离子水、0.6 mL Reagent III、0.6 mL Working Reagent IV、0.6 mL Working Reagent V;

对于96 T, 14.4 mL Working Reagent VI加入1.2 mL去离子水、1.2 mL Reagent III、1.2 mL Working Reagent IV、1.2 mL Working Reagent V, 充分混匀待用。



测定孔

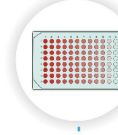
样本

Working Solution

40 μ L
160 μ L

迅速混匀

数据检测



测定20 s和3min 20 s时340 nm吸光度
结果计算