

## 顺乌头酸酶（ACO）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AYHD1-C24	顺乌头酸酶（ACO）活性 检测试剂盒	24T	常量法
AYHD1-C48		48T	

### 一、测定意义：

顺乌头酸酶（ACO）作为三羧酸循环的关键限速酶，其活性测定可反映动物细胞线粒体能量代谢状态：线粒体 ACO（如 ACO2）通过催化柠檬酸与异柠檬酸的可逆转化调控 TCA 循环通量，其活性异常直接关联能量生成障碍，与心肌缺血、肝损伤等代谢性疾病的病理进程密切相关；同时，胞质型 ACO（如 ACO1）兼具铁硫簇结合功能，参与细胞铁稳态调控，其活性变化可作为铁代谢紊乱（如铁过载、贫血）及氧化应激损伤的潜在生物标志物，为相关疾病的机制研究与临床诊断提供重要代谢指标。

### 二、测定原理：

顺乌头酸酶（ACO）催化柠檬酸转化为异柠檬酸后，体系中预先加入的还原型辅酶 NADH 在异柠檬酸脱氢酶的作用下，伴随异柠檬酸的氧化脱羧被氧化为氧化型辅酶 NAD<sup>+</sup>；由于 NADH 在 340nm 波长处具有特征性光吸收，而 NAD<sup>+</sup>在此波长下无显著吸收，因此通过实时监测反应体系在 340nm 处光吸收值的下降幅度，可间接反映 ACO 催化生成异柠檬酸的速率，进而定量评估 ACO 的催化活性。

### 三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(24T)	试剂装量(48T)	保存条件
提取液	液体 30mL×1 瓶	液体 60mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 6mL×1 瓶	液体 12mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 6mL×1 瓶	液体 12mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃保存
<b>试剂三配制：</b> 用时每瓶粉剂加入蒸馏水 6mL，混匀充分溶解，-20℃保存 1 周，避免反复冻融。			
试剂四	液体 6mL×1 瓶	液体 12mL×1 瓶	2-8℃保存

**注：**试剂四为易挥发试剂，使用后-20℃避光密封保存，避免反复冻融。

### 四、操作步骤：

#### 样本前处理

- 组织：按照组织质量 (g) : 提取液体积 (mL) 为 1:5~10 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm, 4℃ 离心 10 min，取上清置冰上待测。
- 细菌、细胞：按照细胞数量  $10^4$  个 : 提取液体积 (mL) 500~1000:1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w, 超声 3s, 间隔 7s, 总时间 3 min），5000 rpm, 4℃ 离心 10min，取上清置冰上待测。

#### 测定步骤

- 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 测定前将试剂恢复至常温；
- 样本测定（在 96 孔板中依次加入下列试剂）：

试剂名称	空白管	测定管
样本 (μL)	-	200
蒸馏水 (μL)	200	-
试剂一 (μL)	200	200
试剂二 (μL)	200	200
试剂三 (μL)	200	200
试剂四 (μL)	200	200

混合均匀，记录 340nm 处 20s 时吸光值 A1 和 5min20s 时的吸光值 A2，计算  $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$ 。 $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ ； $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。（空白管只做 1-2 管）

### 五、顺乌头酸酶（ACO）活性测定：

#### 1、组织、细胞样本活性计算

##### (1) 按样本蛋白浓度计算

**单位定义：**每毫克蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

**计算公式:** ACO (nmol/min/mg) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \div T = 160 \times \Delta A \div Cpr$

## (2) 按样本质量计算

**单位定义:** 每克组织每分钟消耗 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

**计算公式:** ACO (nmol/min/g) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 160 \times \Delta A \div W$

## (3) 按细菌或细胞数量计算:

**单位定义:** 每 1 百万个细菌或细胞每分钟消耗 1nmol NADH 为一个

酶活力单位。

**计算公式:** ACO (nmol /10<sup>4</sup> cell) ) =  $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 0.322 \times \Delta A$

V<sub>反总</sub>: 反应体系总体积, 1×10<sup>-3</sup> L; ε: NADH, 6.22×10<sup>3</sup>L/mol/cm;

d: 比色皿光径, 1cm; V<sub>样</sub>: 加入样本体积, 0.2mL; V<sub>样总</sub>: 加入提

取液体积, 1mL; T: 反应时间, 5min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

10<sup>9</sup>: 单位换算系数, 1mol=10<sup>9</sup>nmol; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

## 六、 注意事项:

1、样本处理需保持低温(如 4℃), 避免反复冻融, 防止酶蛋白变性, 同时需去除样本中可能存在的金属离子螯合剂(如 EDTA), 以免破坏酶活性中心。

2、试剂三易受光和温度影响降解, 需分装避光冻存(-20℃以下), 使用前快速解冻并现配现用。

## 【厂家信息】

生产企业: 南京陌凡生物科技有限公司

地址: 南京市栖霞区红枫科技园 A6 栋 2 层

## 【售后微信】



## 【说明书核准及修改日期】

核准日期: 2025 年 4 月 7 日

修改日期: 2025 年 4 月 7 日