

**ATP-柠檬酸裂解酶（ATP-citrate lyase, ACL）试剂盒说明书**

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

ACL（EC4.1.3.8）是脂肪酸合成中的关键酶，其催化产生的乙酰辅酶A可用于脂肪酸合成和碳链延长、黄酮类物质合成、氨基酸合成等。

测定原理：

ACL在ATP和辅酶A存在的情况下催化柠檬酸裂解为乙酰辅酶A、草酰乙酸、腺苷二磷酸和磷酸盐。苹果酸脱氢酶进一步催化草酰乙酸和NADH生成苹果酸和NAD<sup>+</sup>，在340nm测定NADH减少速率，计算ACL活性。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水

试剂组成和配制：

提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：液体20mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：粉剂×1瓶，-20℃保存；

试剂三：液体2μL×1支，4℃保存；

样本的前处理：

1、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（10<sup>4</sup>个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率20%或200W，超声3s，间隔10s，重复30次）；8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

2、组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

3、血清（浆）样品：直接检测。

测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
2. 样本测定

（1）工作液的配置，将试剂二和试剂三转移至试剂一中，充分混合溶解，置于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴5min；（注意：可取少量试剂一至试剂二和试剂三中，充分混匀溶解后转移至试剂一瓶中，重复2-3遍）；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

（2）在微量石英比色皿或96孔板中加入10μL样本和190μL工作液，混匀，立即记录340nm处20s时的吸光值A1和 2min20s后的吸光值A2，计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

ACL活性计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、血清（浆）ACL活力计算

单位定义：每毫升血清（浆）每分钟消耗1 nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$ACL \text{ (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div V_{\text{样}} \div T = 1608 \times \Delta A$$

## 2、组织、细菌或细胞中ACL活力计算

### (1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每mg组织蛋白每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$ACL \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

### (2) 按样本鲜重计算

单位定义：每g组织每分钟消耗1 nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$ACL \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

### (3) 按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每1万个细胞每分钟消耗1 nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$ACL \text{ (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.216 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.01 mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万。

## b.用96孔板测定的计算公式如下

### 1、血清（浆）ACL活力计算

单位定义：每毫升血清（浆）每分钟消耗1 nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$ACL \text{ (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div V_{\text{样}} \div T = 3216 \times \Delta A$$

### 2、组织、细菌或细胞中ACL活力计算

#### (1) 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每mg组织蛋白每分钟消耗1nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$ACL \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 3216 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

#### (2) 按样本鲜重计算

单位定义：每g组织每分钟消耗1 nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$ACL \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3216 \times \Delta A \div W$$

#### (3) 按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每1万个细胞每分钟消耗1 nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$ACL \text{ (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6.432 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L / mol /cm；d：96孔板光径，0.5cm；V样：加入样本体积，0.01 mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万。