

## ATP-柠檬酸裂解酶（ACL）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC4245

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
提取液一	液体 100 mL×1 瓶	4℃保存
提取液二	液体 1 mL×1 支	-20℃保存
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	4℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂四	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂五	液体 15 μL×1 支	4℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 500 μL 试剂一，充分溶解待用；可分装后-20℃保存，避免反复冻融；
- 2、试剂三：临用前加入 2 mL 试剂一，充分溶解待用；可分装后-20℃保存，避免反复冻融；
- 3、试剂四：临用前加入 0.5 mL 试剂一，充分溶解待用；可分装后-20℃保存，避免反复冻融；
- 4、试剂五：临用前加入 0.5 mL 试剂一，充分溶解待用；可分装后-20℃保存，避免反复冻融；
- 5、提取液的配制：按提取液一：提取液二=990：10（V：V）的比例配制，根据样本量现配现用，**禁止将提取液二一次性全部加入提取液一混匀分装待用。**

**产品说明：**

ATP-柠檬酸裂解酶（ATP-citrate lyase, ACL）是催化柠檬酸生成乙酰辅酶A的关键胞质酶，其催化产生的乙酰辅酶A是合成脂肪酸与胆固醇等脂类物质的主要原料，并可参与相关重要蛋白的修饰作用，是体内能源物质代谢的枢纽性物质。

在ATP和辅酶A存在的情况下，ACL能将柠檬酸催化裂解为乙酰辅酶A、草酰乙酸、ADP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>，导致340nm处光吸收下降。

**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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

**需自备的仪器和用品：**

紫外分光光度计/酶标仪、天平、台式低温离心机、微量石英比色皿/96孔UV板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、水浴锅、冰盒。

**操作步骤：**

**一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）**

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

2、细胞或细菌: 按照细胞或细菌数量 (10<sup>4</sup> 个) : 提取液体积 (mL) 为 500~1000 : 1 的比例 (建议 500 万细胞或细菌加入 1mL 提取液), 冰浴超声波破碎细胞或细菌 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min), 于 4°C, 8000g 离心 10min, 取上清, 置于冰上待测。

3、血清 (浆) 或其他液体: 直接检测。

## 二、测定步骤

1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

2、将试剂一置于 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 10min。

3、操作表 (在微量石英比色皿/96 孔 UV 板中依次加入下列试剂) :

	测定管	空白管
试剂一 (μL)	161	161
试剂二 (μL)	4	4
试剂三 (μL)	20	20
试剂四 (μL)	4	4
试剂五 (μL)	1	1
样本 (μL)	10	-
蒸馏水 (μL)	-	10

在微量石英比色皿/96 孔 UV 板中分别加入上述试剂, 充分混匀后于 340nm 处测定 10s 时的吸光值 A1, 迅速置于 37°C 水浴/ 25°C (其它物种) 或培养箱 2min (酶标仪有控温功能可将温度调至 37°C), 拿出迅速擦干测定 130s 时的吸光值 A2, 计算 ΔA 测定管= A1 测定-A2 测定, ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白, ΔA=ΔA 测定管-ΔA 空白管 (空白管只需做 1-2 次)。

**注意:** 如果样本量大, 可按试剂一 : 试剂二 : 试剂三 : 试剂四 : 试剂五=161 : 4 : 20 : 4 : 1 的比例配制成工作液使用, 工作液应根据样本量现配现用。

## 三、ACL 活性计算

### A、按微量石英比色皿计算:

1. 按样本蛋白浓度计算

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

$$\text{ACL 活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d)] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1607.7 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本质量计算

单位定义: 每 g 组织每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACL 活性 (U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d)] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1607.7 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

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

$$\text{ACL 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d)] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.215 \times \Delta A$$

4. 按液体体积计算

单位定义: 每 mL 液体每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACL (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d)] \div V_{\text{样}} \div T = 1607.7 \times \Delta A$$

V 反总: 反应总体积, 2×10<sup>-4</sup>L; 10<sup>9</sup>: 单位换算系数, 1mol=10<sup>9</sup>nmol; ε: NADH 摩尔消光系数, 6.22×10<sup>3</sup> L/mol/cm;

d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.01mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 蛋白浓度, mg/mL, 蛋白浓度自行测定; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌数量, 500 万。

#### B、按照 96 孔 UV 板计算

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm (96孔板光径) 进行计算即可。

#### 实验实例:

1. 取 0.1g 黑麦草, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆, 于 4°C, 8000g 离心 10min, 取上清, 按照测定步骤操作, 用微量石英比色皿测得计算  $\Delta A$  测定管= A1 测定-A2 测定=1.7569-1.7034=0.0535,  $\Delta A$  空白管=A1 空白-A2 空白=0.459-0.457=0.002,  $\Delta A = \Delta A$  测定管- $\Delta A$  空白管=0.0535-0.002=0.0515, 按样本质量计算得:  
ACL 活性 (U/g 质量) =  $1607.7 \times \Delta A \div W = 827.9655$  U/g 质量。
2. 取 0.1g 肝脏组织, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆, 于 4°C, 8000g 离心 10min, 取上清, 按照测定步骤操作, 用微量石英比色皿测得计算  $\Delta A$  测定管= A1 测定-A2 测定=1.2341-1.0503=0.1838,  $\Delta A$  空白管=A1 空白-A2 空白=0.459-0.457=0.002,  $\Delta A = \Delta A$  测定管- $\Delta A$  空白管=0.1838-0.002=0.1818, 按样本质量计算得:  
ACL 活性 (U/g 质量) =  $1607.7 \times \Delta A \div W = 2922.7986$  U/g 质量。

#### 相关系列产品:

BC0750/BC0755 乙醛脱氢酶 (ALDH) 活性检测试剂盒

BC0410/BC0415 乙酰辅酶A羧化酶 (ACC) 活性检测试剂盒

BC1980/BC1985 总胆固醇 (TC) 含量检测试剂盒

