

## 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。

### 组成:

| 产品名称    | FA004-100T/96S | Storage |
|---------|----------------|---------|
| 提取液: 液体 | 100ml          | 4°C     |
| 试剂一: 液体 | 20ml           | 4°C     |
| 试剂二: 粉剂 | 1 瓶            | -20°C   |
| 试剂三: 液体 | 2 $\mu$ l      | 4°C     |
| 说明书     | 一份             |         |

### 自备仪器和用品:

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

### 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°C 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°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 3、血清 (浆) 样品: 直接检测。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



## 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°C (哺乳动物) 或 25°C (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°C保存, 禁止反复冻融。

(2) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 $\mu$ l 样本和 190 $\mu$ l 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。

$$\text{ACL (nmol/min/ml)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 1608 \times \Delta A$$

#### 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。

$$\text{ACL (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1608 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

##### (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。

$$\text{ACL (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1608 \times \Delta A \div W$$

##### (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。

$$\text{ACL (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.216 \times \Delta A$$

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。

$$\text{ACL (nmol/min/ml)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 3216 \times \Delta A$$

#### 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。

$$\text{ACL (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 3216 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

##### (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。

$$\text{ACL (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3216 \times \Delta A \div W$$

##### (3) 按细菌或细胞密度计算:

最终解释权所有 © 伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司, 保留一切权利



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。

$$ACL \text{ (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6.432 \times \Delta A$$

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。

