

上海茁彩生物科技有限公司  
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0987

Size: 100T/96S

## ATP-柠檬酸裂解酶 (ACL) 检测试剂盒说明书

### 微量法

\*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 一、测定意义:

ACL 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。

#### 二、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  $\text{NAD}^+$ , 在 340nm 测定 NADH 减少速率, 计算 ACL 活性。

#### 三、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。

#### 四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
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 2 μL× 1 支	4℃保存	

## 五、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( $10^4$ 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。

## 六、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 $\Delta A=A1-A2$ 。

## 七、ACL 活性计算:

● 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1nmol 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。

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

$$= 1608 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

### (2) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每分钟消耗 1nmol 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，1mL；T：反应时间，2min；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。

## ● 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。

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

### (2) 按样本鲜重计算

单位定义：每 g 组织每分钟消耗 1nmol 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：

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。

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

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，1mL；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。