

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

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

分光光度法

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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⁺，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、台式离心机、水浴锅、移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水

试剂组成和配制：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	-20℃保存	-
试剂三	液体 5 μL×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 (10⁴ 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°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 1mL 石英比色皿中加入 50 μL 样本和 950 μL 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。

$ACL (nmol/min/mL) = [\Delta A \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{样} \div T = 1608 \times \Delta A \div 2$

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。

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

(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。

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

(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。

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

V 反总: 反应体系总体积, 1×10^{-3} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.05 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。

