

ATP-柠檬酸裂解酶（ACL）检测试剂盒（分光光度法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

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 5μL×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（ 10^4 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℃ 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 1mL 石英比色皿中加入 50μL 样本和 950μL 工作液，混匀，立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A_1 和 2min20s 后的吸光值 A_2 ，计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

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。