

## ATP-柠檬酸裂解酶 (ACL) 检测试剂盒 (微量法)

**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<sup>+</sup>，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 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 2μL×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<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℃ 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) 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10μL 样本和 190μL 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。

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

## 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。

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

### (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：

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，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。