

使用说明书

Instruction Manual

ATP-柠檬酸裂解酶活性检测试剂盒（微量法）

ACL Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

ATP-柠檬酸裂解酶 (ATP-citrate lyase, 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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0013M-ES	100mL×1 瓶	4℃保存
CB0013M-A	20mL×1 瓶	4℃保存
CB0013M-B	粉剂×1 瓶	-20℃保存
CB0013M-C	粉剂×1 支	4℃保存

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品：

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 (UV 板)、研钵、冰和蒸馏水。

二、样本的前处理：

- 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 CB0013M-ES)，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。
- 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 CB0013M-ES)，进行冰浴匀浆；于 4℃，8000g 离心 10min，取上清，置于冰上待测。
- 血清 (浆) 或其他液体：直接检测。

三、测定步骤：

- 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。
- 工作液的配置：将 CB0013M-B 和 CB0013M-C 转移至 CB0013M-A 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 CB0013M-A 至 CB0013M-B 和 CB0013M-C 中，充分混匀溶解后转移至试剂 A 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。
- 样本测定 (在微量石英比色皿或 96 孔板中加入)：

试剂名称	测定管 (μL)
样本	10
工作液	190
混匀，立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 2min 20s 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。	

四、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。

$$ACL (U/mL) = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 1608 \times \Delta A$$

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 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

(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。

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

(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。

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

注：V 反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ 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。

$$ACL (U/mL) = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V \text{ 样} \div T = 3216 \times \Delta A$$

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 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

(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。

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

(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。

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

注：V 反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³ 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。

注意事项

蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。

