

ATP-柠檬酸裂解酶（ACL）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC4245

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 110mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 0.6 mL×2 支	-20℃保存
试剂一	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂四	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	-20℃保存

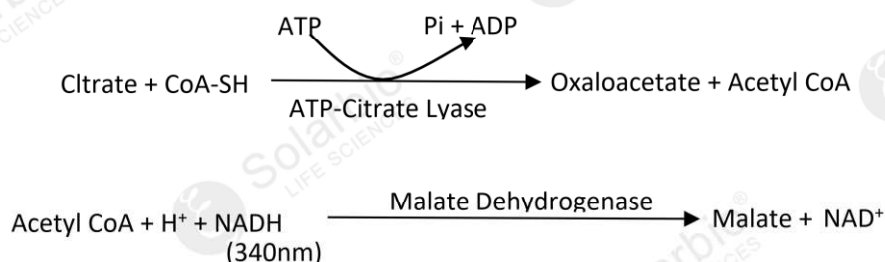
溶液的配制：

- 1、提取液二：为易挥发试剂，用完后尽快密封，-20℃保存；
- 2、试剂二：临用前加入 0.5mL 试剂一，充分溶解；用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 3、试剂三：临用前加入 2.25 mL 试剂一，充分溶解；用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 4、试剂四：临用前加入 0.5 mL 试剂一，充分溶解；用不完的试剂可分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融；
- 5、试剂五：临用前加入 0.5mL 蒸馏水充分溶解；用不完的试剂可分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融；
- 6、试剂五工作液：根据样本量按照试剂五：蒸馏水=0.025mL：0.8mL（共 0.825mL，约 82T）的比例进行配制，现用现配，当天用完；
- 7、提取液的配制：按提取液一：提取液二=990：10（V：V）的比例配制，根据样本量现配现用，**禁止将提取液二一次性全部加入提取液一混匀分装待用。**

产品说明：

ATP-柠檬酸裂解酶（ATP-citrate lyase, ACL）是催化柠檬酸生成乙酰辅酶A的关键胞质酶，其催化产生的乙酰辅酶A是合成脂肪酸与胆固醇等脂类物质的主要原料，并可参与相关重要蛋白的修饰作用，是体内能源物质代谢的枢纽性物质。

在ATP和辅酶A存在的情况下，ACL能将柠檬酸催化裂解为乙酰辅酶A、草酰乙酸、ADP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⁺，导致340nm处光吸收下降。





注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、天平、台式低温离心机、微量石英比色皿/96孔UV板、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、水浴锅/恒温培养箱、冰、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、组织：按照质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g，加入 1mL 提取液）进行冰浴匀浆。于 4℃，8000g 离心 10min，取上清，置于冰上待测。

2、细胞或细菌：按照细胞或细菌数量（10⁴个）：提取液体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞或细菌加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞或细菌（功率 300W，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min），于 4℃，8000g 离心 10min，取上清，置于冰上待测。

3、血清（浆）或其他液体：直接检测。

二、测定步骤

1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、将试剂一置于 37℃水浴 10min。

3、操作表（在微量石英比色皿/96 孔 UV 板中依次加入下列试剂）：

试剂名称	测定管	空白管
试剂一（μL）	152	152
试剂二（μL）	4	4
试剂三（μL）	20	20
试剂四（μL）	4	4
试剂五工作液（μL）	10	10
样本（μL）	10	-
蒸馏水（μL）	-	10

在微量石英比色皿/96 孔 UV 板中分别加入上述试剂，充分混匀后于 340nm 处测定 10s 时的吸光值 A1，迅速置于 37℃水浴或培养箱 2min（酶标仪有控温功能可将温度调至 37℃），拿出迅速擦干测定 130s 时的吸光值 A2，计算 ΔA 测定管 = A1 测定 - A2 测定， ΔA 空白管 = A1 空白 - A2 空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定管 - ΔA 空白管（空白管只需做 1-2 次）。

注意：如果样本量大，可按试剂一：试剂二：试剂三：试剂四：试剂五工作液=152：4：20：4：10 的比例配制成工作液使用，工作液应根据样本量现配现用。

三、ACL活性计算

A、按微量石英比色皿计算：

1. 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位

$$ACL \text{ 活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \times 10^9 \div (\epsilon \times d)] \div (V \text{ 样} \times C_{pr}) \div T = 1607.7 \times \Delta A \div C_{pr}$$

2. 样本质量计算

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。

$$ACL \text{ 活性 (U/g 质量)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \times 10^9 \div (\epsilon \times d)] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 1607.7 \times \Delta A \div W$$



3. 按照细胞数量计算

单位定义：每 1 万个细胞或细菌每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACL 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d)] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1607.7 \times \Delta A \div N$$

4. 按液体体积计算

单位定义：每 mL 液体每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACL (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d)] \div V_{\text{样}} \div T = 1607.7 \times \Delta A$$

V 反总：反应总体积， 2×10^{-4} L； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ ； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：微量石英比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：蛋白浓度，mg/mL，蛋白浓度自行测定；W：样本质量，g；N：细胞或细菌数量，以万计；T：反应时间，2min。

B、按照 96 孔 UV 板计算

1. 按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位

$$\text{ACL 活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d)] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 2679.5 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按样本质量计算

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。

$$\text{ACL 活性 (U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d)] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2679.5 \times \Delta A \div W$$

3. 按照细胞数量计算

单位定义：每 1 万个细胞或细菌每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACL 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d)] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 5.359 \times \Delta A$$

4. 按液体体积计算

单位定义：每 mL 液体每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACL (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d)] \div V_{\text{样}} \div T = 2679.5 \times \Delta A$$

V 反总：反应总体积， 2×10^{-4} L； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ ； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：96 孔 UV 板光径，0.6cm；V 样：加入样本体积，0.01mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：蛋白浓度，mg/mL，蛋白浓度自行测定；W：样本质量，g；500：细胞或细菌数量，500 万，T：反应时间，2min。

实验实例：

- 取 0.1g 黑麦草，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆，于 4℃，8000g 离心 10min，取上清，按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管 = A1 测定 - A2 测定 = 1.7569 - 1.7034 = 0.0535， ΔA 空白管 = A1 空白 - A2 空白 = 0.459 - 0.457 = 0.002， $\Delta A = \Delta A$ 测定管 - ΔA 空白管 = 0.0535 - 0.002 = 0.0515，按样本质量计算得：
 $\text{ACL 活性 (U/g 质量)} = 1607.7 \times \Delta A \div W = 827.9655 \text{ U/g 质量}。$
- 取 0.1g 肝脏组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆，于 4℃，8000g 离心 10min，取上清，按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管 = A1 测定 - A2 测定 = 1.2341 - 1.0503 = 0.1838， ΔA 空白管 = A1 空白 - A2 空白 = 0.459 - 0.457 = 0.002， $\Delta A = \Delta A$ 测定管 - ΔA 空白管 = 0.1838 - 0.002 = 0.1818，按样本质量计算得：
 $\text{ACL 活性 (U/g 质量)} = 1607.7 \times \Delta A \div W = 2922.7986 \text{ U/g 质量}。$

相关发表文献：





[1] Zhang X, Wang Y, Yao H, Deng S, Gao T, Shang L, Chen X, Cui X, Zeng J. Peroxisomal β -oxidation stimulates cholesterol biosynthesis in the liver in diabetic mice. J Biol Chem. 2022 Feb;298(2):101572. doi: 10.1016/j.jbc.2022.101572. Epub 2022 Jan 8. PMID: 35007532; PMCID: PMC8819034.

相关系列产品:

BC0750/BC0755 乙醛脱氢酶 (ALDH) 活性检测试剂盒

BC6020/BC6025 乙酰辅酶A羧化酶 (ACC) 活性检测试剂盒 (酶法)

BC1980/BC1985 总胆固醇 (TC) 含量检测试剂盒

