

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

（货号：G0817F 分光法 48 样）

### 一、产品简介：

ATP-柠檬酸裂解酶（ACL, EC 4.1.3.8）是糖代谢和脂肪酸生物合成的关键酶，其作用底物和产物是糖代谢中的关键中间产物，并可作为脂肪酸合成的底物；同时在植物的生长发育以及提高植物抗逆性方面发挥了重要作用。此外，ACL也是三羧酸循环的关键酶。

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，即可得到ACL酶活性大小。

### 二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体60mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	EP管mg×2支	-20℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部，每支再加1.1mL蒸馏水溶解，溶解好的试剂可-20℃分装保存。
试剂二	液体30mL×1瓶	4℃保存	
试剂三	粉体mg×4支	-20℃保存	临用前甩几下使试剂落入底部，再加3.9mL蒸馏水溶解。用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。

### 三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL石英比色皿（光径1cm）、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、ATP-柠檬酸裂解酶（ACL）活性测定：

建议正式实验前选取2个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

##### ① 组织样本：

称取约0.1g组织（水分充足的果实样本可取0.5g），加1mL提取液，进行冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

**【注】：**也可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为1：5~10的比例进行提取。

##### ② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取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）；12000rpm，4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

**【注】：**若增加样本量，可按照细菌或细胞数量（10<sup>4</sup>个）：提取液体积（mL）为1000~5000：1的比例进行提取

##### ③ 液体样品：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

#### 2、上机检测：

① 可见分光光度计预热30min以上，调波长至340nm，温度设定为25℃，蒸馏水调零。

② 刚从低温下拿出的试剂二和三可在25℃水浴锅中孵育10min。

③ 在1mL石英比色皿（光径1cm）中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	40
试剂一	40
试剂二	440
试剂三	280
混匀, 室温 (25°C) 下, 立即在 340nm 处读取吸光值 A1, 10min 后再读取 A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

## 五、结果计算:

### 1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 25°C 条件下, 每毫克组织蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACL(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 321.5 \times \Delta A \div Cpr$$

### 2、按样本鲜重计算

酶活定义: 25°C 条件下, 每克组织每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACL(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 321.5 \times \Delta A \div W$$

### 3、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 25°C 条件下, 每 1 万个细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACL(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.64 \times \Delta A$$

### 4、按液体体积计算:

酶活定义: 25°C 条件下, 每毫升液体每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACL(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 321.5 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ; V: 加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.04 mL;

T---反应时间, 10min;

500---细菌或细胞总数, 万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

V2---反应体系总体积,  $8 \times 10^4 \text{ L}$ ;

d---光径, 1cm;

W---样本质量, g;