

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

（货号：ADS-F-ZF023 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⁺，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 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 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（10⁴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, $\Delta A=A1-A2$ 。	

- 【注】1. 若 ΔA 差值在零附近徘徊, 可以延长反应时间 10min 到 30min, 则相应的反应时间 T 则代入计算公式重新计算; 或者加大样本上样量 (由 40 μ L 增加到 80 μ L 等), 相应的改变后的加样体积即 V1 和反应总体积 V2 需代入计算公式重新计算; 或者由 0.1g 样本取样量增加到 0.2g, 加 1mL 的提取液研磨提取, 则改变后的取样 W 需代入公式计算。
2. 若下降趋势不稳定, 可以每隔 10S 读取一次吸光值, 选取一段线性下降的时间段来参与计算, 相对应的 A 值也代入计算公式重新计算。
3. 若起始值 A 太大如超过 2 (如颜色较深的植物叶片, 一般色素较高, 则起始值相对会偏高), 可以适当减少样本加样量, 则改变后的加样体积需代入计算公式重新计算。

或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4°C 离心 10min, 上清液用于检测;

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。

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

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。

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

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。

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

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。

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

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$;

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。

V: 加入提取液体积, 1 mL;

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

d---光径, 1cm;

W---样本质量, g;