

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

（货号：ADS-W-ZF023 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	EP 管 1 支	-20℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解，溶解好的试剂可-20℃分装保存。
试剂二	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉体 4 支	-20℃保存	每支： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 每支加 1.9mL 蒸馏水溶解； 3. 用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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 液体样品：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

③ 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

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 340nm，温度可以设定为 25℃。
- 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 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	110
试剂三	70
混匀，室温 (25℃) 下立即在 340nm 处读取吸光值 A1，10min 后再读取 A2， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

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（如：由 10μL 增加到 20μL，则试剂三相应减少，保持总体积 200μL 不变），改变后的加样体积即 V1 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 A1 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℃离心 10min，上清液用于检测。

五、结果计算：

1、按样本鲜重计算

酶活定义：每克组织每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACL(nmol/min/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div W$$

2、按样本蛋白浓度计算：

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

$$ACL(nmol/min/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 643.1 \times \Delta A \div Cpr$$

3、按液体体积计算：

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

$$ACL(nmol/min/mL) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 643.1 \times \Delta A$$

4、按细菌/细胞密度计算：

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

$$ACL(nmol/min/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 1.29 \times \Delta A$$

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

V：加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.01 mL；

V2---反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

T---反应时间，10min；

d---96 孔板光径，0.5cm；

500---细菌或细胞总数，万；

W---样本质量，g；

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。