ATP-柠檬酸裂解酶（ACL）检测试剂盒（定磷法/微量法）

货号：PMK1150BKM

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/24S　96T/48S

适用样本：血清（浆）、动植物组织、细胞、真菌

产品简介

ATP-柠檬酸裂解酶（ATP-citrate lyase，ACL；EC4.1.3.8）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。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，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。试剂盒提供了一种简单的比色法来检测生物样本中 ACL 活性，其原理是 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、ADP 及无机磷。通过测定无机磷增加速率来确定 ACL 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃保存
试剂一	20mL	40mL	4℃保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃避光保存
试剂四	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃避光保存
试剂五	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	4℃避光保存
试剂六	5mL	10mL	室温保存
标准品（10mM 标准磷贮备液）	1mL	1mL	4℃避光保存

自备耗材

酶标仪或分光光度计（能测 660nm 处的吸光度）及恒温箱
96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头
制冰机、低温离心机
去离子水
匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。
提取液：即用型；4℃保存。
试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。
试剂二：临用前配制，48T 加 10mL 试剂一，96T 加 20mL 试剂一，充分混合溶解。用不完的试剂分装-20℃保存，避免反复冻融。
试剂三：临用前配制，48T 加入 2mL 去离子水充分溶解，96T 加入 4mL 去离子水充分溶解后使用。
试剂四：临用前配制，48T 加入 5mL 去离子水充分溶解，96T 加入 10mL 去离子水充分溶解后使用。
试剂五：临用前配制，48T 加入 5mL 去离子水充分溶解，96T 加入 10mL 去离子水充分溶解后使用。
试剂六：即用型；室温保存。

定磷试剂的配制：配制比例按照 H_2O：试剂四：试剂五：试剂六=2:1:1:1 的比例配制，配好的定磷试剂应为浅黄色。若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染（请根据需要，用多少配多少）。

注意：配试剂最好用新的玻璃器皿或者一次性塑料器皿，以避免磷污染。

标准曲线设置：按下表所示用去离子水将 10mM 标准磷贮备液稀释为 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0313、0.0156 mM 的标准溶液。

	标准品体积（μL）	去离子水体积（μL）	标准品浓度（mM）
Std.1	100μL 10mM	900	1
Std.2	100μL of Std.1 (1mM)	100	0.5
Std.3	100μL of Std.2 (0.5mM)	100	0.25
Std.4	100μL of Std.3 (0.25mM)	100	0.125
Std.5	100μL of Std.4 (0.125mM)	100	0.0625
Std.6	100μL of Std.5 (0.0625mM)	100	0.0313
Std.7	100μL of Std.6 (0.0313mM)	100	0.0156

注意：每次实验，请使用新配制的标准品。

样本制备

组织：称取 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

细胞或真菌：收集 500 万细胞或真菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞或真菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 8,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

血清（浆）等液体样本：直接测定。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 Bradford 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 660nm，可见分光光度计去离子水调零。
2. 将试剂二在 37℃(哺乳动物)或 25℃(其它物种)预热 10 分钟。
3. 酶促反应（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

	空白（μL）	标准（μL）	测定（μL）	对照（μL）
样本	0	0	10	10
试剂一	0	0	0	190
试剂二	0	0	190	0
混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确孵育 10min				
试剂三	0	0	20	20
混匀后，室温（25℃左右），4,000g，离心 10min，取上清液				

4. 定磷(在 96 孔板或微量玻璃比色皿中加入下列试剂)

上清	0	0	40	40
不同浓度标准品	0	40	0	0
去离子水	40	0	0	0

定磷试剂	200	200	200	200

混匀，室温静置 10min 后，测定 660nm 吸光值。计算 $\Delta A_{测}=A_{测定}-A_{对照}$，$\Delta A_{标}=A_{标准}-A_{空白}$。（空白和标准曲线只需做 1 次）

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。如果 ΔA 小于 0.001 可适当加大样本量。如果 $A_{测定}$大于 1.5，样本可用提取液适当稀释，计算结果乘以稀释倍数。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准液浓度为 y 轴，$\Delta A_{标}$为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。

2. 无机磷（Pi）含量的计算

将$\Delta A_{测}$带入方程得到 y 值（mM=μmol/mL）。

3. ACL 活性计算

（1）按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位 U。

ACL（U/g 鲜重）＝$(y\times V_{反总})\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\div T\times 1000\times n=2000y\div W\times n$

（2）按液体体积计算：

单位的定义：每 mL 液体样本在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位 U。

ACL（U/mL）＝$(y\times V_{反总})\div V_{样}\div T\times 1000\times n=2000y\times n$

（3） 按细胞数量计算

单位的定义：每 1 万个细胞在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位 U。

ACL（$U/10^4$ Cells）＝$(y\times V_{反总})\div(500\times V_{样}\div V_{样总})\div T\times 1000\times n=4y\times n$

（4）按样本蛋白浓度计算：

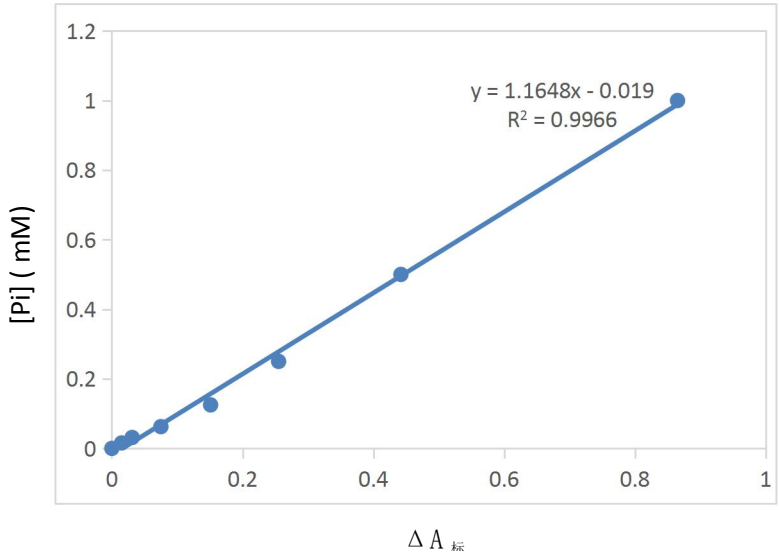
单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟产生 1nmol 无机磷定义为一个酶活性单位 U。

ACL（U/mg prot）＝$(y\times V_{反总})\div(V_{样}\times Cpr)\div T\times 1000\times n=2000y\div Cpr\times n$

$V_{反总}$：反应体系总体积，0.2mL；$V_{样}$：加入样本体积，0.01mL；$V_{样总}$：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，10min；1000：单位换算系数，1μmol/mL=1000 nmol/mL；n：样本稀释倍数；W：样本重量，g；500：细胞总数，500 万；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1019BKM 脂肪酸合成酶（FAS）检测试剂盒(微量法)
PMK1137BKM 游离脂肪酸(FFA)检测试剂盒（微量法）
PMK1138BKM 脂肪酶（LPS)检测试剂盒(微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：