

上海茁彩生物科技有限公司  
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0575

Size: 100T/48S

## 乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 检测试剂盒说明书

### 微量法

\*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 一、测定意义:

乙酰辅酶 A 羧化酶 (Acetyl-CoA carboxylase, ACC) 在生物体内催化乙酰辅酶 A 羧化生成丙二酰辅酶 A, 是脂肪酸和许多次生代谢产物合成的关键酶。ACC 的活性在一定程度上决定了脂肪酸的合成速度和含油量的高低。

#### 二、测定原理:

ACC 能够催化乙酰辅酶 A、 $\text{NaHCO}_3$  和 ATP 生成丙二酰辅酶 A、ADP 和无机磷, 钼蓝与磷酸根生成 660nm 有特征吸收峰的物质, 通过钼酸铵定磷法测定无机磷的增加量来测定 ACC 活性。

#### 三、需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、天平、低温离心机、微量玻璃比色皿/96 孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、漩涡震荡仪、水浴锅、蒸馏水、冰盒、EP 管。

#### 四、试剂的组成和配置：

| 种类                                                                                                | 试剂规格                          | 储存条件     | 使用方法及注意事项                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|----------|-------------------------------------------|
| 提取液一                                                                                              | 液体 110mL×1 瓶                  | 4℃保存     |                                           |
| 提取液二                                                                                              | 液体 1mL×1 支                    | -20℃避光保存 |                                           |
| 试剂一                                                                                               | 液体 10mL×1 瓶                   | 4℃保存     |                                           |
| 试剂二                                                                                               | 粉剂×1 瓶                        | -20℃保存   | 临用前加入 2.5mL 试剂一，充分溶解待用；可分装后-20℃保存，避免反复冻融； |
| 试剂三                                                                                               | 粉剂×1 瓶                        | -20℃保存   | 临用前加入 2mL 双蒸水，充分溶解待用；可分装后-20℃保存，避免反复冻融；   |
| 试剂四                                                                                               | 粉剂×1 瓶                        | 4℃保存     | 临用前加入 5mL 双蒸水，溶解后 4℃保存一周                  |
| 试剂五                                                                                               | 粉剂×1 瓶                        | 4℃保存     | 临用前加入 5mL 双蒸水，溶解后 4℃保存一周                  |
| 试剂六                                                                                               | 液体 5mL×1 瓶                    | 室温保存     |                                           |
| 标准品                                                                                               | 10 μmol/mL 标准磷<br>贮备液 1mL×1 支 | 4℃保存     |                                           |
| 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。                            |                               |          |                                           |
| 工作液（定磷剂）的配制：按 H <sub>2</sub> O：试剂四：试剂五：试剂六=2：1：1：1 的比例配制，配好的工作液应为浅黄色。若变色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，工作液应现配现用。 |                               |          |                                           |
| 注意：配试剂最好用新的烧杯、玻璃棒和玻璃移液器，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。                                                        |                               |          |                                           |

## 五、操作步骤：

### 一、粗酶液提取：

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

细菌或细胞：按照细菌或细胞数量( $10^4$  个) 提取液体积 (mL) 为500~1000: 1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 提取液）冰浴超声波破碎细胞（功率 300w, 超声3 秒, 间隔7 秒, 总时间3min）然后 8000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。

血清(浆):直接测定。

### 二、测定步骤：

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 660nm，蒸馏水调零。
- 2、临用前将试剂一、试剂二、试剂三在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）预热 10min。
- 3、将 10  $\mu\text{mol/mL}$  标准液用蒸馏水稀释为 1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078  $\mu\text{mol/mL}$  的标准溶液备用。
- 4、操作表：

酶促反应：（在 1.5ml 离心管中依次加入下列试剂）

| 试剂名称                 | 对照管 | 测定管 |
|----------------------|-----|-----|
| 试剂一（ $\mu\text{L}$ ） | 90  |     |
| 试剂二（ $\mu\text{L}$ ） | —   | 50  |
| 试剂三（ $\mu\text{L}$ ） | —   | 40  |
| 样本（ $\mu\text{L}$ ）  | 10  | 10  |

37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确反应 30min 后，沸水浴 5min（盖紧，以防止水分散失）冷却后，10000g，25℃离心 5min，取上清。

定磷反应：

| 试剂名称                  | 标准管 | 空白管 | 对照管 | 测定管 |
|-----------------------|-----|-----|-----|-----|
| 标准溶液 (μL)             | 20  | —   | —   | —   |
| H <sub>2</sub> O (μL) | —   | 20  | —   | —   |
| 上清液 (μL)              | —   |     | 20  | 20  |
| 工作液 (μL)              | 180 | 180 | 180 | 180 |

混匀，37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）反应30min，冷却至室温，在660nm处，蒸馏水调零，记录各管吸光值A，分别记为A标准管、A空白管、A对照管和A测定管。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。标准管、空白管只要做一次即可，每个测定管需要设一个对照管。

## 六、ACC 活性计算

### 1、标准曲线的绘制：

以各个标准溶液的浓度为x轴，其对应的 $\Delta A$ 标准为y轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 $\Delta A$ 带入方程得到x（μmol/mL）

### 2、ACC 活性的计算：

#### （1）按蛋白浓度计算

酶活定义：每小时每毫克组织蛋白产生1μmol无机磷的量为一个ACC活力单位

ACC 酶活 (U /mg prot) =  $x \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 20x \div C_{\text{pr}}$ 。

#### （2）按样本质量计算

酶活定义：每小时每g组织产生1μmol无机磷的量为一个ACC活力单位。

ACC 酶活 (U /g 鲜重) =  $x \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 20x \div W$ 。

### (3) 按照细菌或细胞数量计算

酶活定义：每小时每  $10^4$  个细菌或细胞产生  $1 \mu\text{mol}$  无机磷的量为一个 ACC 活力单位。

ACC 酶活 ( $\text{U} / 10^4 \text{ cell}$ ) =  $x \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量 (万个)} \div V_{\text{样总}}) \div T = 20x \div \text{细胞数量 (万个)}$

### (4) 按液体体积计算

酶活定义：每小时每 mL 液体产生  $1 \mu\text{mol}$  无机磷的量为一个 ACC 活力单位。

ACC 酶活 ( $\text{U} / \text{mL}$ ) =  $x \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样}} \div T = 20x$ 。

$V_{\text{总}}$ ：酶促反应总体积，0.1mL； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL；

$T$ ：反应时间，0.5h； $C_{\text{pr}}$ ：样本蛋白质浓度，mg/mL，蛋白浓度自行测定； $W$ ：样本鲜重，g。

## 七、注意事项

- 1、工作液（定磷剂）应现配现用，正常颜色为浅黄色，如有变色或变蓝则均为失效。
- 2、此法具有微量、灵敏、快速的特点。所以对测定所用试管或 EP 管等试验器材均要求严格无磷。
- 3、显色结束后应立即检测。
- 4、当  $\Delta A$  大于 1.5 时，建议将样本用提取液稀释后再进行测定。