

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-S0775

Size: 50T/24S

乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 检测试剂盒说明书

分光光度法

*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、NaHCO₃ 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、天平、低温离心机、1mL 玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器、漩涡振荡仪、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 60mL × 1 瓶	4°C 保存	
提取液二	液体 0.6mL × 1 支	-20°C 避光保存	
试剂一	液体 50mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂 × 1 瓶	-20°C 保存	临用前加入 12.5mL 试剂一, 充分溶解待用; 可分装后 -20°C 保存, 避免反复冻融;
试剂三	粉剂 × 1 瓶	-20°C 保存	临用前加入 6mL 双蒸水, 充分溶解待用; 可分装后 -20°C 保存, 避免反

			复冻融;
试剂四	粉剂×1 瓶	4°C保存	临用前加入 15mL 双蒸水, 溶解后 4°C保存一周
试剂五	粉剂×1 瓶	4°C保存	临用前加入 15mL 双蒸水, 溶解后 4°C保存一周
试剂六	液体 15mL×1 瓶	室温保存	
标准品	10 μmol/mL 标准 磷贮备液 1mL×1 支	4°C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 ₂ 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、粗酶液提取:

1. 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°C, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
2. 细菌或细胞: 收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量(10^4 个): 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°C, 离心10min, 取上清置于冰上待测。
3. 血清(浆): 直接测定。

六、测定步骤：

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 660nm，蒸馏水调零。
- 2、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。
- 3、操作表：(在1.5ml 离心管中依次加入下列试剂) 酶促反应：

试剂名称	对照管	测定管
试剂一 (μL)	450	
试剂二 (μL)	-	250
试剂三 (μL)	-	200
样本 (μL)	50	50

37 $^{\circ}\text{C}$ (哺乳动物) 或 25 $^{\circ}\text{C}$ (其它物种) 准确反应 30min 后，沸水浴 5min (盖紧，以防止水分蒸发散失) 冷却后，10000g，25 $^{\circ}\text{C}$ 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)	100	-	-	-
H ₂ O (μL)	-	100	-	-
上清液 (μL)	-	-	100	100
工作液 (μL)	900	900	900	900

混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ (哺乳动物) 或 25 $^{\circ}\text{C}$ (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。

七、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 ΔA 标准为 y 轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程 $y=kx+b$, 将 ΔA 带入方程得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)

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 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个 ACC 活力单位

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

(2) 按样本质量计算

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

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

(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。

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

(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。

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

$V_{\text{总}}$: 酶促反应总体积, 0.5mL ; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.05mL ; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL ; T : 反应时间, 0.5h ; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL , 蛋白浓度自行测定; W : 样本鲜重, g 。

八、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 ΔA 大于 1 时，建议将样本用提取液稀释后再进行测定。