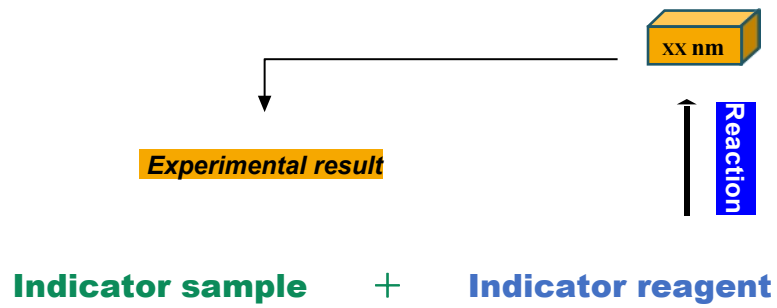


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 活性检测试剂盒说明书

### 微量法

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定

产品简介：

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。

ACC 能够催化乙酰辅酶 A、NaHCO<sub>3</sub> 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。

试验中所需的仪器和试剂：

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。

产品内容：

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 标准磷贮备液 1mL×1 支	4℃保存	-
<p>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。</p> <p>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。</p>			

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

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<sup>4</sup> 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 μmol/mL 标准液用蒸馏水稀释为 1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078 μmol/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（μL）	90	
试剂二（μL）	-	50
试剂三（μL）	-	40
样本（μL）	10	10
<p>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。</p>		

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°C（哺乳动物）或 25°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。

### 三、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 ( $\mu\text{mol/mL}$ )

#### 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。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 总：酶促反应总体积，0.1mL；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，0.5h；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL，蛋白浓度自行测定；W：样本鲜重，g。

#### 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。