

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 (Acetyl-CoA carboxylase, ACC) 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

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	60mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	20mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	-
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存	-
试剂四	粉剂×1 瓶	4℃保存	用时加入25mL 蒸馏水，溶解后4℃可保存一周
试剂五	粉剂×1 瓶	4℃保存	用时加入25mL 蒸馏水，溶解后4℃可保存一周
试剂六	液体 25mL×1 瓶	室温保存	-
试剂七	10 μmol/mL 标准 磷贮备液 10mL× 1 瓶	4℃保存	-

产品说明：

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、NaHCO₃ 和ATP 生成丙二酰辅酶A、ATP 和无机磷，通过钼酸铵定磷法测定无机磷的增加量来测定ACC 活性。

需自备的仪器和用品：

分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本的前处理

1、细菌或培养细胞：先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（10⁴个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议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）；8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

2、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。8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

二、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、酶促反应试剂的配制和预热：在试剂二瓶中加入6.5mL 试剂一，充分溶解混匀；在试剂三瓶中加入5mL 蒸馏水，充分溶解混匀；将试剂一、二、三在37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）预热10 分钟。

3、定磷试剂的配制：按H₂O：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，定磷剂现用现配。

注意：配试剂最好用新的烧杯、玻棒和玻璃移液器，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。

4、0.5 μmol/mL 标准磷应用液配制：将试剂七20倍稀释，即取0.5mL试剂七加9.5 蒸馏水，充分混匀。

5、酶促反应

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

37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）准确反应30min 后，90℃水浴5min（盖紧，以防止水分散失），冷却后，10000g 常温离心5min，取上清

6、定磷

	标准管	空白管	对照管	测定管
0.5 μmol/mL 标准磷应用液	100			
蒸馏水		100		
上清液			100	100
定磷试剂	900	900	900	900

混匀，37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴30min，冷却至室温，在660nm处，蒸馏水调零，记录各管吸光值A。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。

注意：若测定管吸光值大于2，将样品用提取液稀释适当倍数后再进行测定，使吸光值小于2，可提高检测灵敏度，计算公式中乘以相应稀释倍数。

三、ACC 活性计算：

1. 按组织蛋白浓度计算：

定义：每小时每毫克组织蛋白产生1 μmol 无机磷的量为一个 ACC 活力单位。

$$\text{ACC (U/mg prot)} = (C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}) \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) \div T = 10 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div C_{\text{pr}}$$

2. 按样本鲜重计算：

定义：每小时每g 组织产生1 μmol 无机磷的量为一个ACC活力单位。

$$\text{ACC (U/g 鲜重)} = (C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}) \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 10 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$$

3. 按细菌或细胞密度计算:

定义: 每小时每500万细菌或细胞产生1 μmol 无机磷的量为一个ACC活力单位。

$\text{ACC (U/10}^4\text{cell)} = (\text{C 标准管} \times \text{V 总}) \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \times \text{V 总}$

$\div (500 \times \text{V 样} \div \text{V 样总}) \div \text{T} = 0.02 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$

C 标准管: 标准管浓度, 0.5 $\mu\text{mol/mL}$; V 总: 酶促反应总体积, 0.5mL; V 样: 加入样本体积, 0.05mL; V 样总: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 0.5 小时; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本鲜重, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。