

乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)试剂盒(定磷法)试剂盒说明书

(货号: ADS-F-ZF016 分光法 24 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

乙酰辅酶A羧化酶 (ACC, EC 6.4.1.2) 广泛存在于生物界。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 催化乙酰辅酶 A、 NaHCO_3 和 ATP 生成丙二酰辅酶 A、ADP 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 酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	提取液 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 20mL ×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 1 支	-20℃避光保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 0.55mL 蒸馏水, 混匀溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 4mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	A:粉体 1 瓶 B:液体 5mL×1 瓶	4℃避光保存	1. 临用前加 4.57mL 的 B 液, 再加 35.43mL 的蒸馏水, 混匀溶解备用; 2. 需避光, 现配现用, 变蓝色不能使用。
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

【注】: 全程操作需无磷环境; 试剂配置用新枪头和玻璃移液器等, 也可用一次性塑料器皿, 避免磷污染。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

- ① 组织样本: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃离心 15min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例提取

- ② 细胞样本:

先收集细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细胞加入 1mL 提取液; 超声波破碎细胞(冰浴,

功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)；4℃ 约 12,000rpm 离心 10min，取上清作为待测样品。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量 (10^4)：提取液 (mL) 为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上，设置温度 37℃，调节波长至 700nm，蒸馏水调零。
- ② 试剂放在 37℃ 水浴 5min；
- ③ 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
试剂一	280	300
样本	150	150
试剂二	20	
37℃ 孵育 30min		
试剂三	60	60
混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测		

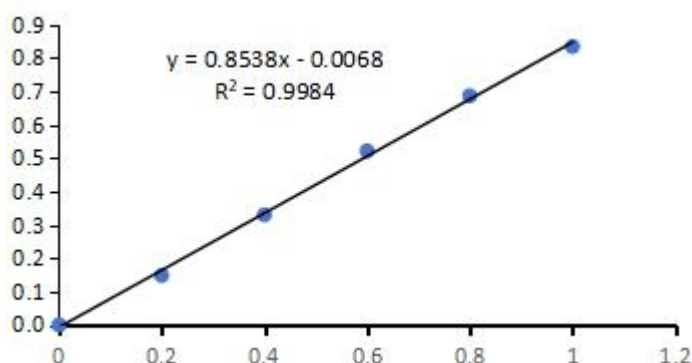
- ④ 显色反应，在 EP 管中依次加入：

上清液	150	150
试剂四	600	600
混匀，室温静置 3min，全部澄清液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。		

【注】若 ΔA 差值小于 0.01，可增加样本取样质量 W（如增至 0.2g），或增加③步中样本加样体积 V1（如由 150μL 增至 300μL，则试剂一相应减少），或延长③步中 37℃ 条件下孵育时间 T（如由 30min 延至 60min），则改变后的 W 和 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.8538x - 0.0068$ ，x 是标准品摩尔质量 ($\mu\text{mol/mL}$)，y 是 ΔA 。



- 2、按蛋白浓度计算：

定义：每小时每毫克组织蛋白分解 ATP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力 ($\mu\text{mol/h/mg prot}$) = $[(\Delta A + 0.0068) \div 0.8538 \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T = 7.96 \times (\Delta A + 0.0068) \div Cpr$

- 3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织分解 ATP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重})=[(\Delta A+0.0068)\div 0.8538\times V_2]\div (W\times V_1\div V)\div T$$

$$=7.96\times (\Delta A+0.0068)\div W$$

4、按细菌或细胞密度计算：

定义：每小时每 1 万个细菌或细胞分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A+0.0068)\div 0.8538\times V_2]\div (500\times V_1\div V)\div T=0.016\times (\Delta A+0.0068)$$

V---加入提取液体积，1mL； V1---加入样本体积，0.15mL； V2---酶促反应总体积，0.51mL；
T---反应时间，1/2 小时； W---样本鲜重，g； 500---细菌或细胞总数，500 万；
Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标准品用 1mL 试剂一溶解。（母液需在两天内用），标准品母液浓度为 50 $\mu\text{mol/mL}$ 。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 20 μL ，加入 980 μL 蒸馏水，混匀得到 1 $\mu\text{mol/mL}$ 的标品稀释液待用。						
标品浓度 $\mu\text{mol/mL}$	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 μL	0	40	80	120	160	200
水 μL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	150	
蒸馏水		150
试剂二	600	600
混匀，室温静置 3min，全部澄清液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A=A$ 测定-0 浓度管。		