

乙酰辅酶 A 羧化酶(Acetyl CoA carboxylase, ACC)试剂盒说明书

(货号: ADS-W-ZF016-96 微板法 96 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、无机磷和ADP, ADP与磷酸烯醇式丙酮酸在丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶的逐一作用下, 使NADH氧化为 NAD^+ , 通过检测NADH在340nm处的下降量来计算ACC的酶活力大小。

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	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 1 支	-20℃避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2mim 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 1.2mL 蒸馏水充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 4 支	-20℃保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2mim 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 加 0.55mL 的蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂三	粉剂 2 支	-20℃保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2mim 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 2 支	-20℃保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2mim 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用, 可分装冻存, 禁止反复冻融; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂五	液体 15mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂六	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2mim 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

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）、96孔板、离心管、酶标仪、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。

③ 液体样本：澄清的液体样本直接检测，若浑浊离心后取上清测定。

2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，设置温度 37℃,调节波长至 340nm。

② 试剂可放在 37℃水浴 5-15min；

③ 试剂一和二和三和四和五可按照 10:20:10:10:130 比例配成混合液（一枪加 180μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用），在 96 孔板中依次加入：

试剂组分	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	20
试剂三	10
试剂四	10
试剂五	130
混匀，37℃下，孵育 10min	
试剂六	10
混匀，37℃下，立即于 340nm 处读取吸光值 A1，10min 后读取 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。	

【注】：1.若 ΔA 过小，可以延长反应时间（如：22min 或更长）再读取 A2，或增加样本加样量 V1（如增至 40μL，则试剂五相应减小），重新调整的反应时间 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

2.若 A2 值小于 0.45 或 ΔA 大于 0.6，则需缩短反应时间 T（如减至 12min）再读取 A2 或减少样本量 V1（如减至 5μL，则试剂五相应增加），重新调整的反应时间 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACC(nmol/min/mg \text{ prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (V_1 \times C_{pr}) \div T=643.1 \times \Delta A \div C_{pr}$$

2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACC(\text{nmol/min/g 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 643.1 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACC(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 1.29 \times \Delta A$$

4、按液体体积计算：

单位定义：每毫升液体样本每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$ACC(\text{nmol/min/mL})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div V_1 \div T = 643.1 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

d ---96 孔板光径, 0.5cm ;

V ---加入提取液体积, 1 mL ;

V_1 ---加入样本体积, 0.01mL ;

V_2 ---反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

T ---反应时间, 10 min ;

W ---样本质量, g ;

500 ---细胞数量, 万;

C_{pr} ---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。