

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

(分光法 24 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
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 mg×1 支	-20℃ 保存	用前甩几下使试剂落入底部, 再加 0.55mL 蒸馏水, 混匀溶解备用。
试剂三	液体 4mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 3mL×1 瓶	4℃ 保存	临用前加 2.9mL 的 B 液, 再加 37.1mL 的蒸馏水, 混匀溶解备用。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

【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、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

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、上机检测:

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:

试剂名称 (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		

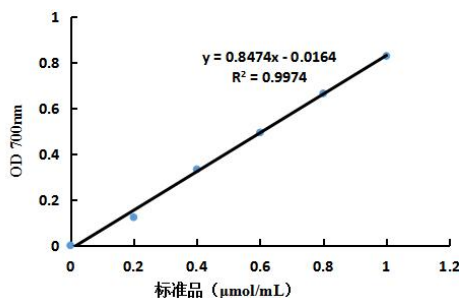
④ 显色反应, 在 EP 管中依次加入:

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, $\Delta A = A$ 测定 -A 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 150 μ L 增至 300 μ L, 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: $y = 0.8474x - 0.0164$, 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 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力($\mu\text{mol/h/mg prot}$) = $[(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T = 8.03 \times (\Delta A + 0.0164) \div Cpr$

3、按样本鲜重计算:

定义: 每小时每克组织分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力($\mu\text{mol/h/g 鲜重}$) = $[(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T$
 $= 8.03 \times (\Delta A + 0.0164) \div W$

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。

酶活力($\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}$) = $[(\Delta A + 0.0164) \div 0.8474 \times V2] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.016 \times (\Delta A + 0.0164)$

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 制备标准品母液 (50 $\mu\text{mol/mL}$): 标准品用 1mL 试剂一溶解。(母液需在两天内用)。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. $\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据显色反应阶段测定管的加样体系操作, 根据结果即可制作标准曲线。