

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

(微板法 48 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 60mL×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 2mL×1 瓶	4℃ 保存	临用前加 1.8mL 的 B 液, 再加 23.2mL 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:

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min 以上, 设置温度 37℃, 调节波长至 700nm。

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	190	200
样本	100	100

试剂二	10	
37°C 孵育 30min		
试剂三	40	40
混匀, 12000rpm, 4°C 离心 5min, 上清液待测。		

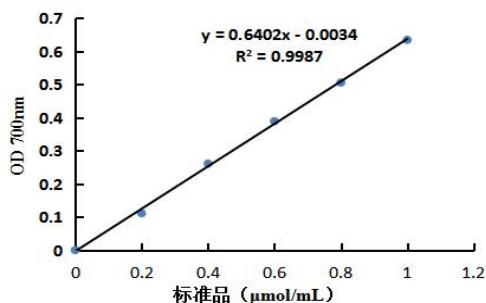
④ 显色反应, 在 96 孔板中依次加入:

上清液	50	50
试剂四	200	200
混匀, 室温静置 3min, 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 V_1 (如由 100 μL 增至 200 μL , 则试剂一相应减少), 或延长③步中 37°C 条件下孵育时间 T (如由 30min 延至 60min), 则改变后的 W 和 V_1 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: $y = 0.6402x - 0.0034$, 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。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6404 \times V_2] \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 10.62 \times (\Delta A + 0.0034) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6404 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 10.62 \times (\Delta A + 0.0034) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h} / 10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0034) \div 0.6404 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.021 \times (\Delta A + 0.0034)$$

V ---加入提取液体积, 1mL; V_1 ---加入样本体积, 0.1mL; V_2 ---酶促反应总体积, 0.34mL;

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;

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。

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。