

## 乙酰辅酶A羧化酶（ACC）检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1450

产品规格：100管/48样

### 产品简介：

乙酰辅酶A羧化酶（Acetyl-CoA carboxylase, 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、NaHCO<sub>3</sub>和ATP生成丙二酰辅酶A、ADP和无机磷，钼蓝与磷酸根生成660nm有特征吸收峰的物质，通过钼酸铵定磷法测定无机磷的增加量来测定ACC活性。

**注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

### 试验中所需的仪器和试剂：

可见分光光度计/酶标仪、天平、低温离心机、微量玻璃比色皿/96孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、漩涡震荡仪、水浴锅、蒸馏水、冰盒、EP管。

### 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体110mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体1mL×1支	-20℃
试剂一	液体7mL×1瓶	2-8℃
试剂二（A）	液体3mL×1瓶	2-8℃
试剂二（B）	粉剂×1支	-20℃
试剂二（C）	粉剂×1支	-20℃
试剂三	粉剂×1瓶	-20℃
试剂四	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂五	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂六	液体5mL×1瓶	室温
标准品	液体1mL×1支	2-8℃

### 溶液的配制：

1. 试剂二：临用前将试剂二B、试剂二C倒入试剂二A，充分溶解待用；可分装后-20℃保存，避免反复冻融；
2. 试剂三：临用前加入2mL双蒸水，充分溶解待用；可分装后-20℃保存，避免反复冻融；
3. 试剂四：临用前加入5mL双蒸水，溶解后4℃保存一周；
4. 试剂五：临用前加入5mL双蒸水，溶解后4℃保存一周；
5. 标准品：10μmol/mL标准磷贮备液；
6. 提取液的配制：按提取液一：提取液二=990：10（V：V）的比例配制，根据样本量现配现用，**禁止将提取液二一次性全部加入提取液一混匀分装待用**；
7. 工作液（定磷剂）的配制：按H<sub>2</sub>O：试剂四：试剂五：试剂六=2:1:1:1的比例配制，配好的工作液应为浅黄色；若变色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，工作液应现配现用；

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



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

### 操作步骤 (仅供参考) :

#### 一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1. 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, 取上清液待测。
2. 细菌或细胞: 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 ( $10^4$  个) : 按照细菌或细胞数量 ( $10^4$  个) : 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 提取液), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 然后 8000g, 4℃, 离心 10min, 取上清置于冰上待测。
3. 液体: 直接检测。

#### 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. 临用前将试剂一、试剂二、试剂三在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 预热 10min。
3. 10 $\mu$ mol/mL 标准液用蒸馏水稀释为 1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078 $\mu$ mol/mL 的标准溶液备用。
4. 操作表: (在 1.5mL 离心管中依次加入下列试剂)

##### (1) 酶促反应:

试剂名称 ( $\mu$ L)	对照管	测定管
试剂一	90	-
试剂二	-	50
试剂三	-	40
样本	10	10
37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 准确反应 30min 后, 沸水浴 5min (盖紧, 以防止水分蒸发散失), 冷却后, 10000g, 25℃ 离心 5min, 取上清。		

##### (2) 定磷反应:

试剂名称 ( $\mu$ L)	标准管	空白管	对照管	测定管
标准溶液	20	-	-	-
H <sub>2</sub> O	-	20	-	-
上清液	-	-	20	20
工作液	180	180	180	180
混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 反应 30min, 冷却至室温, 在 660nm 处, 蒸馏水调零, 记录各管吸光值 A, 分别记为 A 标准管、A 空白管、A 对照管和 A 测定管。 $\Delta A = A$ 测定管 - A 对照管, $\Delta A$ 标准 = A 标准管 - A 空白管 (标准管、空白管只要做 1-2 次即可, 每个测定管需要设一个对照管)。				

#### 三、ALDH 酶活计算

##### 1. 标准曲线的绘制:

以各个标准溶液的浓度为 x 轴, 其对应的  $\Delta A$  标准为 y 轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程  $y=kx+b$ , 将  $\Delta A$  带入方程得到 x ( $\mu$ mol/mL)。

##### 2. 按蛋白浓度计算

酶活定义: 每小时每毫克组织蛋白产生 1 $\mu$ mol 无机磷的量为一个 ACC 活力单位。

$$\text{ACC 酶活 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 20x \div C_{\text{pr}}$$

##### 3. 按样本质量计算

酶活定义: 每小时每 g 组织产生 1 $\mu$ mol 无机磷的量为一个 ACC 活力单位。

$$\text{ACC 酶活 (U/g 质量)} = x \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 20x \div W$$

##### 4. 按照细菌或细胞数量计算



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

酶活定义：每小时每  $10^4$  个细菌或细胞产生  $1\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个 ACC 活力单位。

ACC 酶活 ( $\text{U}/10^4\text{cell}$ ) =  $x \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{细胞数量 (万个)} \div V_{\text{样总}}) \div T = 20x \div \text{细胞数量 (万个)}$

5. 按液体体积计算

酶活定义：每小时每 mL 液体产生  $1\mu\text{mol}$  无机磷的量为一个 ACC 活力单位。

ACC 酶活 ( $\text{U}/\text{mL}$ ) =  $x \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样}} \div T = 20x$

V 总：酶促反应总体积，0.1mL；V 样：加入样本体积，0.01mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，0.5h；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL，蛋白浓度自行测定；W：样本质量，g。

**注意事项：**

1. 工作液（定磷剂）应现配现用，正常颜色为浅黄色，如有变色或变蓝则均为失效。
2. 此法具有微量、灵敏、快速的特点。所以对测定所用试管或 EP 管等试验器材均要求严格无磷。
3. 显色结束后应立即检测。
4. 当  $\Delta A$  大于 1.5 时，建议将样本用提取液稀释后再进行测定。
5. 由于提取液中含有蛋白（约  $1\text{mg}/\text{mL}$ ），若需要测定样本的蛋白浓度，需要减去提取液本身的蛋白浓度。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com