

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

(货号: G0913W 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°C保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉体 mg×1 支	-20°C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°C保存	
试剂四	A:粉体 mg×1 瓶 B:液体 2mL×1 瓶	4°C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°C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,了解本批样品和实验流程,避免样本和试剂浪费!

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°C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);12,000rpm×4°C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: 直接检测;若浑浊,12000rpm×4°C离心 15min,离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上,设置温度 37°C,调节波长至 700nm。

② 试剂放在 37°C水浴 5min;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	

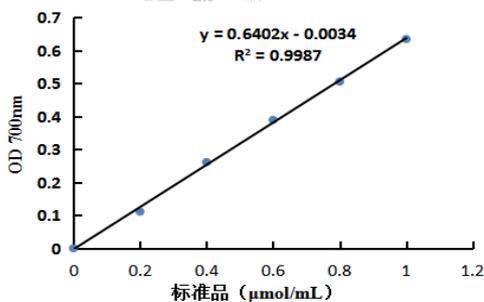
37°C 孵育 30min		
试剂三	40	40
混匀, 12000rpm, 4°C离心 5min, 上清液待测。		

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, ΔA=A 测定-A 对照 (每个样本做一个自身对照)。		

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 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力($\mu\text{mol/h/mg prot}$)= $[(\Delta A+0.0034)\div 0.6402\times V2]\div(V1\times Cpr)\div T=10.62\times(\Delta A+0.0034)\div Cpr$

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。

酶活力($\mu\text{mol/h/g 鲜重}$)= $[(\Delta A+0.0034)\div 0.6402\times V2]\div(W\times V1\div V)\div T=10.62\times(\Delta A+0.0034)\div W$

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 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力($\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}$)= $[(\Delta A+0.0034)\div 0.6402\times V2]\div(500\times V1\div V)\div T=0.021\times(\Delta A+0.0034)$

5、按液体体积计算:

定义: 每毫升液体样本每小时分解 ATP 产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力($\mu\text{mol/h/mL 液体}$)= $[(\Delta A+0.0034)\div 0.6402\times V2]\div V1\div T=10.62\times(\Delta A+0.0034)$

V---加入提取液体积, 1mL; V1---加入样本体积, 0.1mL; V2---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, 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 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. $\mu\text{mol/mL}$ 。
- 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。