

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

(微板法 96 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、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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部,再加 1.2mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×4 支	-20°C保存	每支用前甩几下使试剂落入底部,再加 0.55mL 的蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20°C保存,禁止反复冻融,三天内用完。
试剂三	粉剂 mg×2 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部,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。
试剂四	粉剂 mg×2 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部,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。
试剂五	液体 15mL×1 瓶	4°C保存	
试剂六	粉剂 mg×1 支	-20°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用。

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°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);4°C 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、上机检测：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，设置温度 37°C,调节波长至 340nm。
- ② 试剂可放在 37°C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：

试剂名称	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°C下，孵育 10min	
试剂六	10
混匀，37°C下，立即于 340nm 处读取吸光值 A1， 10min 后读取 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。	

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。

$$ACC(nmol/min/mg \text{ prot})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T=643.1 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

$$ACC(nmol/min/g \text{ 鲜重})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T=643.1 \times \Delta A \div W$$

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。

$$ACC(nmol/min/10^4 \text{ cell})=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T=1.29 \times \Delta A$$

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。

$$ACC(nmol/min/mL)=[\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T=643.1 \times \Delta A$$

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；

V1---加入样本体积，0.01mL；

V2---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；

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。