

## 乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

货号：BC0410

规格：50T/24S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 30 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 0.6 mL×1 支	-20℃保存
试剂一	液体 35 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二 A	液体 7.5 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二 B	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂二 C	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂六	液体 15 mL×1 瓶	常温保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

1. 提取液二：为易挥发试剂，用完后尽快密封，-20℃保存；
2. 试剂二：临用前将取试剂二 B、试剂二 C 倒入试剂二 A，充分溶解待用；可分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融；
3. 试剂三：临用前加入 6 mL 蒸馏水，充分溶解待用；可分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融；
4. 试剂四：临用前加入 15 mL 蒸馏水，溶解后 2-8℃保存 4 周；
5. 试剂五：临用前加入 15 mL 蒸馏水，溶解后 2-8℃保存 4 周；
6. 标准品：10 μmol/mL 标准磷贮备液；
7. 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；
8. 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；

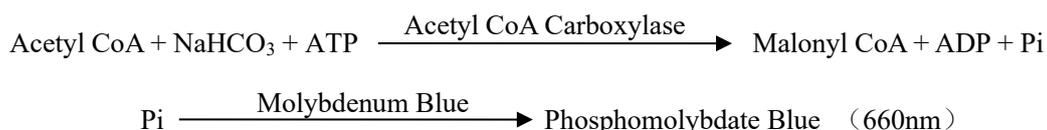
**注意：**配试剂最好用新的烧杯、玻璃棒和玻璃移液器，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。

**产品说明：**

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。

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、分析天平、低温离心机、1mL玻璃比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、漩涡震荡仪、水浴锅/恒温培养箱、蒸馏水、冰、EP管。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参文献）

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，然后 8000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。

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）：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、血清（浆）：直接测定。

#### 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、临用前根据样本量将试剂一、试剂二、试剂三在37℃预热10min。

3、将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。标准液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度（ $\mu$ mol/mL）	标准液体积（ $\mu$ L）	蒸馏水体积（ $\mu$ L）	稀释后浓度（ $\mu$ mol/mL）
1	10	100	700	1.25
2	1.25	200	200	0.625
3	0.625	200	200	0.3125
4	0.3125	200	200	0.15625
5	0.15625	200	200	0.078

备注：试验中需标准品 100 $\mu$ L。

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	对照管	测定管
试剂一（ $\mu$ L）	450	-
试剂二（ $\mu$ L）	-	250
试剂三（ $\mu$ L）	-	200
样本（ $\mu$ L）	50	50

37°C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°C离心5min，取上清。

(2) 定磷反应:

试剂名称	标准管	空白管	对照管	测定管
标准溶液 (μL)	100	-	-	-
蒸馏水 (μL)	-	100	-	-
上清液 (μL)	-	-	100	100
工作液 (μL)	900	900	900	900

混匀，37°C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。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ （标准曲线、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、ACC 活性计算

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 (μmol/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1μmol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1μmol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

酶活定义：每小时每10<sup>4</sup>个细菌或细胞产生1μmol无机磷的量为一个ACC活力单位。

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

5. 按液体体积计算

酶活定义：每小时每mL液体产生1μmol无机磷的量为一个ACC活力单位。

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

V总：酶促反应总体积，0.5mL；V样：加入样本体积，0.05mL；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；N：细菌或细胞数量，以万计。

**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时，建议将样本用蒸馏水稀释后再进行测定。

5、 由于提取液中含有蛋白（约 1mg/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。

**实验实例：**

1. 取0.1g苦麻菜，加入1mL提取液，进行冰浴匀浆，然后8000g 4°C离心10min，取上清，之后按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.519 - 0.092 = 0.427$ ，标准曲线 $y = 0.7329x + 0.0109$ ，则 $x = 0.5677$ ，按样本质量计算酶活得：ACC酶活（U/g 质量） $= 20x \div W = 113.54$  U/g 质量。
2. 取 0.1g 肝脏组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，然后 8000g 4°C离心 10min，之后按照测定步骤操作，测得计算  $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.445 - 0.238 = 0.207$ ，标准曲线  $y = 0.7329x + 0.0109$ ，则  $x = 0.2676$ ，按样本质量计算酶活得：ACC 酶活（U/g 质量） $= 20x \div W = 53.52$  U/g 质量。

**相关系列产品：**

- BC1080/BC1085 乙醇脱氢酶（ADH）活性检测试剂盒
- BC2350/BC2355 酰基转移酶（AAT）活性检测试剂盒
- BC0750/BC0755 乙醛脱氢酶（ALDH）活性检测试剂盒