

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

(货号: G0914W 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， $\Delta A=A1-A2$ 。 | |

【注】：1.若 ΔA 过小，可以延长反应时间（如：22min 或更长）再读取 A2，或增加样本加样量 V1（如增至 40μL，则试剂五相应减小），重新调整的反应时间 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

2.若 A2 值小于 0.45 或 ΔA 大于 0.6，则需缩短反应时间 T（如减至 12min）再读取 A2 或减少样本量 V1（如减至 5μL，则试剂五相应增加），重新调整的反应时间 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

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。

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

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。

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

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。

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

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。

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

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L}/\text{mol}/\text{cm}$ ；

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。