

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℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20℃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℃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℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂三	粉剂 mg×1 支	-20℃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。
试剂四	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂 mg×1 支	-20℃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℃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℃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℃, 调节波长至 340nm。

② 试剂放在 37°C 水浴 5min;

③ 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	150
混匀, 37°C 下, 孵育 10min	
试剂五	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 40 μ L, 则试剂四相应减小), 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 5 μ L, 则试剂四相应增加), 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。

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

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 $\times 10^3$ 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 $\times 10^{-4}$ L;

T---反应时间, 10 min;

W---样本质量, g;

500---细胞数量;

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。