

## 乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)试剂盒(定磷法)试剂盒说明书

(货号: BP10198F 分光法 24 样 有效期: 3 个月)

### 一、指标介绍:

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、 $\text{NaHCO}_3$  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:

| 试剂组分 | 试剂规格                     | 存放温度      | 注意事项                                                                       |
|------|--------------------------|-----------|----------------------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 提取液 30mL×1 瓶             | 4°C保存     |                                                                            |
| 试剂一  | 液体 20mL ×1 瓶             | 4°C保存     |                                                                            |
| 试剂二  | 粉体 1 支                   | -20°C避光保存 | 1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩);<br>2. 加入 0.55mL 蒸馏水, 混匀溶解备用;<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |
| 试剂三  | 液体 4mL×1 瓶               | 4°C保存     |                                                                            |
| 试剂四  | A:粉体 1 瓶<br>B:液体 5mL×1 瓶 | 4°C避光保存   | 1. 临用前加 4.57mL 的 B 液, 再加 35.43mL 的蒸馏水, 混匀溶解备用;<br>2. 需避光, 现配现用, 变蓝色不能使用。   |
| 标准品  | 粉体 1 支                   | 4°C保存     | 1. 若重新做标曲, 则用到该试剂;<br>2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制;<br>3. 溶解后的标品一周内用完。              |

【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、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

#### 1、样本提取:

- 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。

## 2、检测步骤：

- ① 分光光度计预热 30min 以上，设置温度 37℃，调节波长至 700nm，蒸馏水调零。
- ② 试剂放在 37℃水浴 5min；
- ③ 在 EP 管中依次加入：

| 试剂组分（μL）                    | 测定管 | 对照管 |
|-----------------------------|-----|-----|
| 试剂一                         | 280 | 300 |
| 样本                          | 150 | 150 |
| 试剂二                         | 20  |     |
| 37℃ 孵育 30min                |     |     |
| 试剂三                         | 60  | 60  |
| 混匀，12000rpm，4℃离心 5min，上清液待测 |     |     |

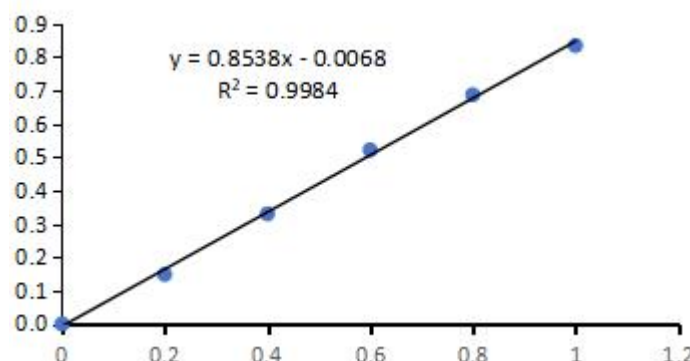
- ④ 显色反应，在 EP 管中依次加入：

|                                                                                                             |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 上清液                                                                                                         | 150 | 150 |
| 试剂四                                                                                                         | 600 | 600 |
| 混匀，室温静置 3min，全部澄清液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。 |     |     |

【注】若  $\Delta A$  差值小于 0.01，可增加样本取样质量 W（如增至 0.2g），或增加③步中样本加样体积 V1（如由 150μL 增至 300μL，则试剂一相应减少），或延长③步中 37℃条件下孵育时间 T（如由 30min 延至 60min），则改变后的 W 和 V1 和 T 需代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算：

- 1、标准曲线方程： $y = 0.8538x - 0.0068$ ，x 是标准品摩尔质量（μmol/mL），y 是  $\Delta A$ 。



- 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 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力(μmol/h/mg prot) =  $[(\Delta A + 0.0068) \div 0.8538 \times V2] \div (V1 \times Cpr) \div T = 7.96 \times (\Delta A + 0.0068) \div Cpr$

- 3、按样本鲜重计算：

定义：每小时每克组织分解 ATP 产生 1μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

酶活力(μmol/h/g 鲜重) =  $[(\Delta A + 0.0068) \div 0.8538 \times V2] \div (W \times V1 \div V) \div T$

$$=7.96 \times (\Delta A + 0.0068) \div W$$

#### 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 $\mu$ mol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0068) \div 0.8538 \times V_2] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 0.016 \times (\Delta A + 0.0068)$$

V---加入提取液体积，1mL； V1---加入样本体积，0.15mL； V2---酶促反应总体积，0.51mL；

T---反应时间，1/2 小时； W---样本鲜重，g； 500---细菌或细胞总数，500 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 标准品用 1mL 试剂一溶解。（母液需在两天内用），标准品母液浓度为 50 $\mu$ mol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1  $\mu$ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

| 吸取标准品母液 20 $\mu$ L，加入 980 $\mu$ L 蒸馏水，混匀得到 1 $\mu$ mol/mL 的标品稀释液待用。 |     |     |     |     |     |     |
|---------------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标品浓度<br>$\mu$ mol/mL                                                | 0   | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1   |
| 标品稀释液<br>uL                                                         | 0   | 40  | 80  | 120 | 160 | 200 |
| 水 uL                                                                | 200 | 160 | 120 | 80  | 40  | 0   |
| 各标准管混匀待用。                                                           |     |     |     |     |     |     |

- 3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

| 试剂名称 ( $\mu$ L)                                                                                   | 标准管 | 0 浓度管 (仅做一次) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------|
| 标品                                                                                                | 150 |              |
| 蒸馏水                                                                                               |     | 150          |
| 试剂二                                                                                               | 600 | 600          |
| 混匀，室温静置 3min，全部澄清液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$ 。 |     |              |