

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

分光光度法 50 管/24 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

ACC 能够催化乙酰辅酶 A、 NaHCO_3 和 ATP 生成丙二酰辅酶 A、ATP 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 活性。

需自备的仪器和用品：

分光光度计、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成：

提取液：60mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂一：20mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。用时加入 25mL 蒸馏水，溶解后 4℃ 可保存一周。

试剂五：粉剂×1 瓶，4℃ 保存。用时加入 25mL 蒸馏水，溶解后 4℃ 可保存一周。

试剂六：液体 25mL×1 瓶，室温保存。

试剂七：10μmol/mL 标准磷贮备液 10mL×1 瓶，4℃ 保存。

样本的前处理：

1、细菌或培养细胞：先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 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、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。8000g 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

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、酶促反应试剂的配制和预热：在试剂二瓶中加入 6.5mL 试剂一，充分溶解混匀；在试剂三瓶中加入 5mL 蒸馏水，充分溶解混匀；将试剂一、二、三在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 预热 10 分钟。
 - 3、定磷试剂的配制：按 H₂O: 试剂四: 试剂五: 试剂六=2:1:1:1 的比例配制，配好的定磷试剂应为浅黄色，若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，定磷剂现用现配。
- 注意：配试剂最好用新的烧杯、玻棒和玻璃移液器，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。
- 4、0.5μmol/mL 标准磷应用液配制：将试剂七 20 倍稀释，即取 0.5mL 试剂七加 9.5 蒸馏水，充分混匀。
 - 5、酶促反应

试剂名称 (μL)	对照管	测定管
试剂一	450	
试剂二		250
试剂三		200
样本	50	50

37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 准确反应 30min 后，90℃ 水浴 5min (盖紧，以防止水分散失)，冷却后，10000g 25℃ 离心 5min，取上清

6、定磷

	标准管	空白管	对照管	测定管
0.5μmol/mL 标准磷应用液	100			
蒸馏水		100		
上清液			100	100
定磷试剂	900	900	900	900

混匀，37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 30min，冷却至室温，在 660nm 处，蒸馏水调零，记录各管吸光值 A。标准管、空白管只要做一次即可，每个测定管需要设一个对照管。

注意：若测定管吸光值大于 2，将样品用提取液稀释适当倍数后再进行测定，使吸光值小于 2，可提高检测灵敏度，计算公式中乘以相应稀释倍数。

ACC 活性计算:

1、按组织蛋白浓度计算:

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。

$$\text{ACC } (\mu\text{mol/h/mg prot}) = \frac{(C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}) \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) \div T} = 10 \times \frac{(A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div C_{\text{pr}}}$$

2、按样本鲜重计算:

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。

$$\text{ACC } (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = \frac{(C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}) \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T} = 10 \times \frac{(A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W}$$

3、按细菌或细胞密度计算:

定义：每小时每 500 万细菌或细胞产生 1μmol 无机磷的量为一个 ACC 活力单位。

$$\text{ACC } (\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = \frac{(C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}) \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T} = 0.02 \times \frac{(A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管})}{(A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})}$$

C 标准管：标准管浓度，0.5μmol/mL；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，0.5 小时；C_{pr}：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本鲜重，g；500：细菌或细胞总数，500 万。