



乙酰辅酶 A 羧化酶活性检测试剂盒 ACC Assay Kit

微量法

产品编号: AK482M
产品规格: 100T/48S
产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES482	100mL×1 瓶	4℃保存;
AK482-A	10mL×1 瓶	4℃保存;
AK482-B	粉剂×1 瓶	4℃保存;
AK482-C	粉剂×1 瓶	-20℃保存;
AK482-D	粉剂×1 瓶	4℃保存; 用时加入25mL蒸馏水, 溶解后4℃可保存一周。
AK482-E	粉剂×1 瓶	4℃保存; 用时加入25mL蒸馏水, 溶解后4℃可保存一周。
AK482-F	25mL×1 瓶	室温保存;
AK482-S	10μmol/mL	标准磷储备液 10mL×1 瓶, 4℃保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 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。

原理: ACC 能够催化乙酰辅酶 A、NaHCO₃ 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。

自备用品:

分光光度计/酶标仪、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

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 (10⁴ 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 ES482), 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 ES482), 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 AK482-B 瓶中加入 2.5mL AK482-A, 充分溶解混匀; 在 AK482-C 瓶中加入 2mL 蒸馏水, 充分溶解混匀; 将 AK482-A, AK482-B, AK482-C 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: AK482-D: AK482-E: AK482-F = 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 AK482-S 20 倍稀释, 即取 0.5mL AK482-S 加 9.5 蒸馏水, 充分混匀。
5. 酶促反应:

试剂名称	对照管 (ul)	测定管 (ul)
------	----------	----------

AK482-A	90	
AK482-B		50
AK482-C		40
样本	10	10
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

试剂名称	标准管(ul)	空白管(ul)	对照管(ul)	测定管(ul)
AK482-S (0.5μmol/mL)	20			
蒸馏水		20		
上清液			20	20
定磷试剂	180	180	180	180
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。

ACC (μmol/h/mg prot)

$$= (C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}) \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T$$

$$= 10 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div Cpr$$

2. 按样本鲜重计算：

单位定义：每小时每 g 组织产生 1μmol 无机磷的量为一个 ACC 活力单位。

ACC (μmol/h/g 鲜重)

$$= (C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}) \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总} \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 10 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$$

3. 按细菌或细胞密度计算

单位定义：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。

ACC (U/10⁴ cell)

$$= (C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}) \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \times V \text{ 总} \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T$$

$$= 0.02 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

注：C 标准管：标准管浓度，0.5μmol/mL；V 总：酶促反应总体积，0.1mL；V 样：加入样本体积，0.01mL；V

样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，0.5 小时；Cpr：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。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))