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

微量法 100管/48样

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。

自备仪器和样品：

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。

试剂的组成

提取液：100mL×1瓶，4℃保存；

试剂一：10mL×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。

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

测定步骤

1、 分光光度计或酶标仪预热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2.5mL试剂一，充分溶解混匀；在试剂三瓶中加入2mL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H_2O: 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	90	
试剂二		50
试剂三		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

	标准管	空白管	对照管	测定管
0.5μmol/mL标准磷应用液	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）保温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标准管×V总)×(A测定管-A对照管)÷(A标准管-A空白管)÷

(V样×Cpr)÷T=10×(A测定管-A对照管)÷(A标准管-A空白管)÷Cpr

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。

ACC (μmol/h /g鲜重)=(C标准管×V总)×(A测定管-A对照管)÷(A标准管-A空白管）×V总÷

(W× V样÷V样总)÷T=10×(A测定管-A对照管)÷(A标准管-A空白管)÷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。

ACC (U/10^4 cell)=(C标准管×V总)×(A测定管-A对照管)÷(A标准管-A空白管）×V总÷

(500× V样÷V样总)÷T=0.02×(A测定管-A对照管)÷(A标准管-A空白管)

C标准管：标准管浓度，0.5μmol/mL；V总：酶促反应总体积，0.1mL；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。