



乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0415

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 0.6 mL×2 支	-20℃保存
试剂一	液体 7 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二 A	液体 3 mL×1 支	2-8℃保存
试剂二 B	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂二 C	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂四	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	粉剂×1 瓶	2-8℃保存
试剂六	液体 5 mL×1 瓶	常温保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

1. 提取液二：为易挥发试剂，用完后尽快密封，-20℃保存；
2. 试剂二：临用前将试剂二 B、试剂二 C 倒入试剂二 A，充分溶解待用；可分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融；
3. 试剂三：临用前加入 2 mL 蒸馏水，充分溶解待用；可分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融；
4. 试剂四：临用前加入 5 mL 蒸馏水，溶解后 2-8℃保存 4 周；
5. 试剂五：临用前加入 5 mL 蒸馏水，溶解后 2-8℃保存 4 周；
6. 标准品：10 μmol/mL 标准磷贮备液；
7. 提取液的配制：按提取液一：提取液二=990：10 (V：V) 的比例配制，根据样本量现配现用，禁止将提取液二一次性全部加入提取液一中；
8. 工作液（定磷剂）的配制：按 H₂O：试剂四：试剂五：试剂六=2:1:1:1 的比例配制，配好的工作液应为浅黄色；若变色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染，工作液应现配现用；

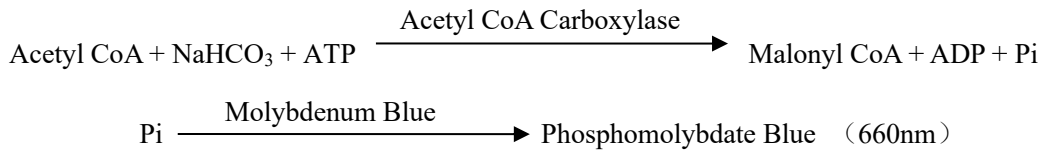
注意：配试剂最好用新的烧杯、玻璃棒和玻璃移液器，也可以用一次性塑料器皿，避免磷污染。

产品说明：

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。

ACC能够催化乙酰辅酶A、NaHCO₃和ATP生成丙二酰辅酶A、ADP和无机磷，钼蓝与磷酸根生成660nm有特征

吸收峰的物质，通过钼酸铵定磷法测定无机磷的增加量来测定ACC活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、分析天平、低温离心机、微量玻璃比色皿/96 孔板、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、漩涡震荡仪、水浴锅/恒温培养箱、蒸馏水、冰、EP 管。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

- 1、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，然后 8000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
- 2、细菌或细胞：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 万细胞加入 1mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；然后 8000g，4℃，离心 10min，取上清置于冰上待测。
- 3、血清（浆）：直接测定。

二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 660nm，分光光度计用蒸馏水调零。
- 2、临用前根据样本量将试剂一、试剂二、试剂三在 37℃预热 10min。
- 3、将 10μmol/mL 标准液用蒸馏水稀释为 1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078μmol/mL 的标准溶液备用。

标准液稀释可参考下表：

序号	稀释前浓度 (μmol/mL)	标准液体积 (μL)	蒸馏水体积 (μL)	稀释后浓度 (μmol/mL)
1	10	100	700	1.25
2	1.25	200	200	0.625
3	0.625	200	200	0.3125
4	0.3125	200	200	0.15625
5	0.15625	200	200	0.078

备注：试验中需标准品 20μL。

4、操作表：

(1) 酶促反应：(在 1.5mL 离心管中依次加入下列试剂)

试剂名称	对照管	测定管
试剂一 (μL)	90	-
试剂二 (μL)	-	50
试剂三 (μL)	-	40
样本 (μL)	10	10

37°C准确反应30min后，沸水浴5min（盖紧，以防止水分散失），冷却后，10000g，25°C离心5min，取上清。

(2) 定磷反应：

试剂名称	标准管	空白管	对照管	测定管
标准溶液（ μL ）	20	-	-	-
蒸馏水（ μL ）	-	20	-	-
上清液（ μL ）	-	-	20	20
工作液（ μL ）	180	180	180	180

混匀，37°C反应 30min，冷却至室温，在 660nm 处，记录各管吸光值 A，分别记为 A 标准管、A 空白管、A 对照管和 A 测定管。 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ （标准曲线、空白管只要做 1-2 次即可，每个测定管需要设一个对照管）。

三、ACC 活性计算

1. 标准曲线的绘制：

以各个标准溶液的浓度为 x 轴，其对应的 ΔA 标准为 y 轴，绘制标准曲线，得到标准方程 $y = kx + b$ ，将 ΔA 带入方程得到 x ($\mu\text{mol/mL}$)。

2. 按蛋白浓度计算

酶活定义：每小时每毫克组织蛋白产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个 ACC 活力单位

$$\text{ACC 酶活 (U/mg prot)} = x \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 20x \div \text{Cpr}$$

3. 按样本质量计算

酶活定义：每小时每 g 组织产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个 ACC 活力单位。

$$\text{ACC 酶活 (U/g 质量)} = x \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T = 20x \div W$$

4. 按照细菌或细胞数量计算

酶活定义：每小时每 10^4 个细菌或细胞产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个 ACC 活力单位。

$$\text{ACC 酶活 (U/10}^4 \text{ cell)} = x \times V_{\text{总}} \div (V_{\text{样}} \times N) \div V_{\text{样总}} \div T = 20x \div N$$

5. 按液体体积计算

酶活定义：每小时每 mL 液体产生 $1\mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个 ACC 活力单位。

$$\text{ACC 酶活 (U/mL)} = x \times V_{\text{总}} \div V_{\text{样}} \div T = 20x$$

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，0.5h；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL，蛋白浓度自行测定；W：样本质量，g；N：细菌或细胞数量，以万计。

注意事项：

- 1、工作液（定磷剂）应现配现用，正常颜色为浅黄色，如有变色或变蓝则均为失效。
- 2、此法具有微量、灵敏、快速的特点。所以对测定所用试管或 EP 管等试验器材均要求严格无磷。
- 3、显色结束后应立即检测。
- 4、当 ΔA 大于 1.5 时，建议将样本用蒸馏水稀释后再进行测定。
- 5、由于提取液中含有蛋白（约 1mg/mL ），若需要测定样本的蛋白浓度，需要减去提取液本身的蛋白浓度。

实验实例：

1. 取0.1g苦麻菜，加入1mL提取液，进行冰浴匀浆，然后8000g 4°C离心10min，取上清，之后按照测定步骤操作，用96孔板测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.326 - 0.079 = 0.247$ ，标准曲线 $y = 0.4799x + 0.0004$ ，则 $x = 0.5139$ ，按样本质量计算酶活得：

ACC酶活 (U/g 质量) = $20x \div W = 102.78$ U/g 质量。

2. 取 0.1g 小鼠肝脏组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆，然后 8000g 4°C离心 10min，之后按照测定步骤操作，用 96 孔板测得计算 $\Delta A = A_{\text{测定管}} - A_{\text{对照管}} = 0.27 - 0.163 = 0.107$ ，标准曲线 $y = 0.4799x + 0.0004$ ，则 $x = 0.2221$ ，按样本质量计算酶活得：

ACC 酶活 (U/g 质量) = $20x \div W = 44.42$ U/g 质量。

相关系列产品：

- BC1080/BC1085 乙醇脱氢酶 (ADH) 活性检测试剂盒
- BC2350/BC2355 酰基转移酶 (AAT) 活性检测试剂盒
- BC0750/BC0755 乙醛脱氢酶 (ALDH) 活性检测试剂盒