

使用说明书

Instruction Manual

乙酰辅酶 A 羧化酶活性检测试剂盒（微量法）

ACC Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/48S 规格的产品组成如下:

组成	规格	储存条件
CB0005M-ES	100mL×1 瓶	4°C保存。
CB0005M-A	10mL×1 瓶	4°C保存。
CB0005M-B	粉剂×1 瓶	4°C保存。
CB0005M-C	粉剂×1 瓶	-20°C保存。
CB0005M-D	粉剂×1 瓶	4°C保存; 用时加入 25mL 蒸馏水, 溶解后 4°C可保存一周。
CB0005M-E	粉剂×1 瓶	4°C保存; 用时加入 25mL 蒸馏水, 溶解后 4°C可保存一周。
CB0005M-F	25mL×1 瓶	室温保存。
CB0005M-S	10mL×1 瓶	标准磷贮备液 (10μmol/mL), 4°C保存。

操作说明

1. 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、微量玻璃比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

2. 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 CB0005M-ES), 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°C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 CB0005M-ES), 进行冰浴匀浆。8000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

3. 测定步骤:

1) 分光光度计/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 CB0005M-B 瓶中加入 2.5mL CB0005M-A, 充分溶解混匀; 在 CB0005M-C 瓶中加入 2mL 蒸馏水, 充分溶解混匀; 将 CB0005M-A, CB0005M-B, CB0005M-C 在 37°C(哺乳动物)或 25°C(其它物种)预热 10 分钟。

3) 定磷试剂的配制: 按 H₂O: CB0005M-D : CB0005M-E : CB0005M-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。

- 4) 0.5 μ mol/mL 标准磷应用液配制：将试剂 CB0005M-S 20 倍稀释，即取 0.5mL CB0005M-S 加 9.5 蒸馏水，充分混匀。
5) 酶促反应：

试剂名称	对照管 (μ L)	测定管 (μ L)
CB0005M-A	90	
CB0005M-B		50
CB0005M-C		40
样本	10	10

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

- 6) 定磷：

试剂名称	标准管 (μ L)	空白管 (μ L)	对照管 (μ L)	测定管 (μ L)
CB0005M-S (0.5 μ mol/mL)	20			
蒸馏水		20		
上清液			20	20
定磷试剂	180	180	180	180

混匀, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (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 1-2 次即可, 每个测定管需要设一个对照管。

注：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。

4. 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 1 μ mol 无机磷的量为一个 ACC 活力单位。

$$\text{ACC (U/mg prot)} = (\text{C 标准管} \times \text{V 总}) \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div (\text{V 样} \times \text{Cpr}) \div \text{T} = 10 \times (\text{A 测定管} - \text{A 对照管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{Cpr}$$

- 2) 按样本鲜重计算：

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

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

- 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 1 μ mol 无机磷的量为一个 ACC 活力单位。

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

注：C 标准管：标准管浓度, 0.5 μ mol/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。

注意事项

1. 配制试剂时最好用新的烧杯、玻棒和玻璃移液器, 也可以用一次性塑料器皿, 避免磷污染。
2. 蛋白定量测定, 建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
3. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
4. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

