



## 乙酰辅酶 A 羧化酶活性检测试剂盒

### ACC Assay Kit

分光光度法

产品编号: AK482V

产品规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

| 编号      | 规格        | 储存条件                            |
|---------|-----------|---------------------------------|
| ES482   | 60mL×1 瓶  | 4℃ 保存;                          |
| AK482-A | 20mL×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 | 标准磷酸盐储备液 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、NaHCO<sub>3</sub> 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、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。

#### 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<sup>4</sup> 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 6.5mL AK482-A, 充分溶解混匀; 在 AK482-C 瓶中加入 5mL 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 H<sub>2</sub>O: 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                                                                           | 450 |     |
| AK482-B                                                                           |     | 250 |
| AK482-C                                                                           |     | 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

| 试剂名称                                                                                          | 标准管(ul) | 空白管(ul) | 对照管(ul) | 测定管(ul) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| AK482-S<br>(0.5μmol/mL)                                                                       | 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。

ACC (μmol/h/mg prot)

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

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

##### 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)

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

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

##### 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 (μmol/h/10<sup>4</sup> cell)

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

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

**注：**C 标准管：标准管浓度，0.5μmol/mL；V 总：酶促反应总体积，0.5mL；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<sub>pr</sub>：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](#))