

乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)检测试剂盒（微量法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

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。

试剂七：10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 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。

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、0.5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 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。

$$\text{ACC } (\mu\text{mol/h/mg prot}) = (C \text{ 标准管} \times V \text{ 总}) \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 对照管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div (V \text{ 样} \times C_{\text{pr}}) \div T$$

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

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。

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

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

3、按细菌或细胞密度计算:

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。

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

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

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;

C_{pr}: 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。