

乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 检测试剂盒 (微量法)

货号: PMK1145

保存: -20℃避光保存 6 个月

规格: 48T/96T

适用样本: 血清 (浆)、动植物组织、细胞、细菌

产品简介

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 广泛存在于生物界, 在许多所知的乙酰辅酶 A 羧化酶中, 对大肠杆菌中的酶了解得最清楚。本试剂盒可检测生物体内 ACC 活性, 其原理是 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计算 ACC 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	50mL	100mL	4℃ 保存
试剂二	1mL	2mL	4℃ 避光保存
试剂三	10mL	10mL	4℃ 保存
试剂四	粉剂 × 1 瓶	粉剂 × 1 瓶	4℃ 保存
试剂五	粉剂 × 1 瓶	粉剂 × 1 瓶	-20℃ 保存
试剂六	粉剂 × 1 瓶	粉剂 × 1 瓶	4℃ 避光保存
试剂七	粉剂 × 1 瓶	粉剂 × 1 瓶	4℃ 避光保存
试剂八	25mL	25mL	室温保存
标准品 (10 μmol/mL 标准磷贮备液)	1mL	1mL	4℃ 保存

自备耗材

酶标仪或可见分光光度计 (能测 660nm 处的吸光度)
96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头
恒温箱、低温离心机、制冰机
去离子水
匀浆器 (如果是组织样本)

试剂准备

注意: 各组分 (小管试剂) 开盖前, 请先低速离心。

提取液的配制: 临用前按 1mL 试剂一中加入 10μL 试剂二的比例配制提取液。根据样本数量现用现配。

试剂三: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4℃ 保存。

试剂四: 临用前加入 2.5mL 试剂三充分溶解混匀。溶解后的试剂可 4℃ 保存一周, 也可分装 -20℃ 长期保存, 避免反复冻融。

产品说明书

试剂五：临用前加入 2mL 去离子水，充分溶解混匀（可取 1 个 5mL EP 管加入 2mL 去离子水，先加入少量水到试剂五瓶中，完全溶解以后将所有溶液吸取到 5mL EP 管中混匀）。溶解后的试剂可 4℃ 保存一周，也可分装-20℃ 长期保存，避免反复冻融。

试剂六：临用前加 25mL 去离子水溶解；4℃ 避光保存。溶解后的试剂可 4℃ 保存一周，也可分装-20℃ 长期保存，避免反复冻融。

试剂七：临用前加 25mL 去离子水溶解；4℃ 避光保存。溶解后的试剂可 4℃ 保存一周，也可分装-20℃ 长期保存，避免反复冻融。

1 μmol/mL 标准磷应用液配制：将标准品（10 μmol/mL 标准磷贮备液）10 倍稀释，如取 0.1mL 试剂七加 0.9mL 去离子水充分混匀。

定磷试剂的配制：按去离子水:试剂六:试剂七:试剂八=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，根据需要多少配多少。

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。

样本制备

动物组织：称取 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，8,000g，4℃ 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

植物组织：称取 0.1g 样本，加入 1mL 提取液捣碎，冰浴超声波破碎 5min（功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），8,000g，4℃ 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

细胞或细菌：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 8,000g，4℃ 离心 10min，取上清液，置冰上待测。

血清（浆）等液体样本：直接测定。

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃ 保存 1 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 Bradford 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 660nm，可见分光光度计去离子水调零。
2. 将试剂三、四、五在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）预热 10 分钟。
3. 酶促反应（在 EP 管中依次加入下列试剂）：

	对照管（μL）	测定管（μL）
试剂三	90	0
试剂四	0	50
试剂五	0	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。

4. 定磷（在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入下列试剂）：

	标准孔（μL）	空白孔（μL）	对照孔（μL）	测定孔（μL）
1 μmol/mL 标准磷应用液	20	0	0	0
去离子水	0	20	0	0
上清液	0	0	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，测定 660nm 吸光值。分别记为 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ ，计算 $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。标准孔、空白孔只要做一次即可，每个测定管需要设一个对照管。

产品说明书

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 ΔA 小于 0.005 可适当加大样本量。如果 $A_{\text{测定}}$ 大于 2，样本可用提取液适当稀释，计算结果乘以稀释倍数。

结果计算

1. 按样本鲜重计算：

定义：每小时每 g 组织在反应体系中产生 $1 \mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个 ACC 活力单位。

$$\text{ACC}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = (C_{\text{标}} \times V_{\text{反总}}) \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 20 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div W$$

2. 按液体体积计算：

定义：每小时每 mL 液体样本在反应体系中产生 $1 \mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个 ACC 活力单位。

$$\text{ACC}(\mu\text{mol/h/mL}) = (C_{\text{标}} \times V_{\text{反总}}) \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div V_{\text{样}} \div T = 20 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}})$$

3. 按组织蛋白浓度计算：

定义：每小时每毫克组织蛋白在反应体系中产生 $1 \mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个 ACC 活力单位。

$$\text{ACC}(\mu\text{mol/h/mg prot}) = (C_{\text{标}} \times V_{\text{反总}}) \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 20 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div \text{Cpr}$$

4. 按细菌或细胞密度计算：

定义：每小时每 500 万细菌或细胞在反应体系中产生 $1 \mu\text{mol}$ 无机磷的量为一个 ACC 活力单位。

$$\text{ACC}(\text{U}/10^4 \text{ cells}) = (C_{\text{标}} \times V_{\text{反总}}) \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}}) \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.04 \times (\Delta A_{\text{测}} \div \Delta A_{\text{标}})$$

$C_{\text{标}}$ ：标准品浓度， $1 \mu\text{mol/mL}$ ； $V_{\text{反总}}$ ：酶促反应总体积， 0.1mL ； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积， 0.01mL ； $V_{\text{样总}}$ ：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. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1137 游离脂肪酸 (FFA) 检测试剂盒 (微量法)
PMK1019 脂肪酸合成酶 (FAS) 检测试剂盒 (微量法)
PMK1138 脂肪酶 (LPS) 检测试剂盒 (微量法)
PMK1006 丙酮酸脱羧酶 (PDC) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

