乙酰辅酶 A 羧化酶(Acetyl CoA carboxylase，ACC)试剂盒说明书

（微板法 96 样）

一、产品简介：

乙酰辅酶A羧化酶（ACC，EC 6.4.1.2）广泛存在于生物界。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催化乙酰辅酶A、$NaHCO_3$和ATP生成丙二酰辅酶A、无机磷和ADP，ADP与磷酸烯醇式丙酮酸在丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶的逐一作用下，使NADH氧化为NAD^+，通过检测NADH在340nm处的下降量来计算ACC的酶活力大小。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，再加 1.2mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂二	粉剂 mg×4 支	-20℃保存	每支用前甩几下使试剂落入底部，再加 0.55mL 的蒸馏水溶解备用。用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂三	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用，可分装冻存，禁止反复冻融。
试剂四	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，每支再加 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用，可分装冻存，禁止反复冻融。
试剂五	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，再加 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、乙酰辅酶 A 羧化酶（ACC）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃离心 15min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量(g)：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例提取

② 细胞样本：

先收集细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细胞加入 1mL 提取液；超声波破碎细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；4℃ 约 12,000rpm 离心 10min，取上清作为待测样品。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量(10^4)：提取液(mL)为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：澄清的液体样本直接检测，若浑浊离心后取上清测定。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，设置温度 37℃,调节波长至 340nm。

② 试剂可放在 37℃水浴 5-15min；

③ 试剂一和二和三和四和五可按照 10:20:10:10:130 比例配成混合液（一枪加 180μL 该混合液）（**该混合液用多少配多少，现配现用**），在 96 孔板中依次加入：

试剂名称	测定管
样本	10
试剂一	10
试剂二	20
试剂三	10
试剂四	10
试剂五	130
混匀，37℃下，孵育 10min	
试剂六	10
混匀，37℃下，立即于 340nm 处读取吸光值 A1，10min 后读取 A2，△A=A1-A2。	

五、结果计算：

1、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

ACC(nmol/min/mg prot)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(V1×Cpr)÷T=643.1×ΔA÷Cpr

2、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

ACC(nmol/min/g 鲜重)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(W×V1÷V)÷T=643.1×ΔA÷W

3、按细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

ACC(nmol/min/10^4 cell)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷(500×V1÷V)÷T=1.29×ΔA

4、按液体体积计算：

单位定义：每毫升液体样本每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

ACC(nmol/min/mL)=[ΔA÷(ε×d)×V2×10^9]÷V1÷T=643.1×ΔA

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10^3 L/mol/cm；　　d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1 mL；　　V1---加入样本体积，0.01mL；

V2---反应体系总体积，2×10^{-4} L；　　T---反应时间，10 min；

W---样本质量，g；　　500---细胞数量，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。