

CheKine™ 乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 活性检测试剂盒 (微量法)

货号: KTB1261

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

	适用样本: 动植物组织、细菌和细胞、血清 (浆) 或其他液体
	保质期: -20°C, 避光保存 6 个月

01 背景与原理

乙酰辅酶 A 羧化酶 (Acetyl CoA Carboxylase, ACC) (EC 6.4.1.2) 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。

本试剂盒检测原理是 ACC 能够催化乙酰辅酶 A、NaHCO₃ 和 ATP 生成丙二酰辅酶 A、ADP 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。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	60×2 mL	4°C, 避光保存
Reagent I	12.5 mL	25 mL	4°C
Reagent II	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4°C, 避光保存
Reagent III	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20°C, 避光保存
Reagent IV	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4°C, 避光保存
Reagent V	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4°C, 避光保存
Reagent VI	5 mL	10 mL	RT
Standard	1 mL	1 mL	4°C

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 660 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水、PBS	试剂配制用/样本清洗用
其他	匀浆器（组织样本）、水浴锅、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本公司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存；Extraction Buffer 有毒且有刺激性气味，建议在通风橱进行实验
Reagent I	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Working Reagent II	临用前配制；48 T 加入 5 mL Reagent I，96 T 加入 10 mL Reagent I，充分溶解	未用完的试剂 4℃避光保存可稳定 1 个月
Working Reagent III	临用前配制；48 T 加入 4 mL 去离子水，96 T 加入 8 mL 去离子水，充分溶解	未用完的试剂-20℃避光分装保存 1 个月，避免反复冻融
Working Reagent IV	临用前配制；48 T 加入 5 mL 去离子水，96 T 加入 10 mL 去离子水，充分溶解	未用完的试剂 4℃避光保存可稳定 1 周
Working Reagent V	临用前配制；48 T 加入 5 mL 去离子水，96 T 加入 10 mL 去离子水，充分溶解	未用完的试剂 4℃避光保存可稳定 1 周
Reagent VI	即用型	室温保存；Reagent VI 具有腐蚀性，建议在通风橱进行实验
Standard	即用型；10 μmol/mL 标准磷贮备液，使用前平衡到室温	4℃保存
0.5 μmol/mL Standard	取 50 μL Standard 加 950 μL 去离子水，充分混匀	每次实验，请使用新配制的标准品；配制好后需要在 4 h 之内使用

05-2 样本制备

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。测定时，应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时，需在4 h内完成样品解冻。

- 组织：称取约0.1 g组织，加入1 mL Extraction Buffer，冰浴匀浆，8000 g，4℃离心10 min，取上清液，置冰上待测。
- 细胞或细菌：收集 5×10^6 个细胞或细菌，用预冷的PBS清洗细胞或细菌，800 g离心2 min，弃上清。加入1 mL Extraction Buffer进行冰浴超声破碎。超声波破碎5 min（功率20%或200 W，超声3 s，间隔7 s，重复30次），4℃，8000 g离心10 min，取上清置于冰上待测。
- 血清（浆）等液体样本：直接测定。

05-3 实验步骤

注意：1.配制 Working Reagent 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.配好的 Working Reagent 应为浅黄色，若无色则试剂失效，若是蓝色则为磷污染。

3.显色结束后应立即检测，最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。

1. 酶标仪准备：预热30 min以上，调节波长到660 nm。

2. Working Reagent 的配置：按去离子水：Working Reagent IV：Working Reagent V：Reagent VI=2：1：1：1的比例配制，现用现配。检测前，将 Reagent I、Working Reagent II、Working Reagent III在37℃(哺乳动物)或25℃（其它物种）预热10 min。

3. 检测体系配制：空白管和标准管只需做1-2次，每个测定管需要设一个对照管。在1.5 mL离心管中按照如下方式操作：

试剂	空白孔 (μL)	标准孔 (μL)	测定孔 (μL)	对照孔 (μL)
样本	0	0	10	10
Reagent I	0	0	0	90
Working Reagent II	0	0	50	0
Working Reagent III	0	0	40	0
37℃(哺乳动物)或25℃（其它物种）准确反应30 min后，90℃灭活5 min（盖紧，以防止水分散失），冷却后，10000 g，25℃离心5 min，取上清。在96孔板中按照如下方式操作：				
上清液	0	0	20	20
0.5 μmol/mL Standard	0	20	0	0
去离子水	20	0	0	0
Working Reagent	180	180	180	180

4. 吸光度检测：充分混匀，37℃(哺乳动物)或25℃（其它物种）孵育30 min后，冷却至室温。测定660 nm处吸光值。分别记为 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 、 $A_{\text{测定}}$ 、 $A_{\text{对照}}$ 。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn) > 进入“技术中心”> 查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$

2. 样本 ACC 活性计算

● 按样本蛋白浓度计算

酶活单位定义：每毫克蛋白每小时产生 1 μmol 无机磷的量定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACC(U/mg prot)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 10 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div \text{Cpr}$$

● 按样本质量计算

酶活单位定义：每克样本每小时产生 1 μmol 无机磷的量定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACC(U/g)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 10 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$$

● 按细胞或细菌数量计算

酶活单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每小时产生 1 μmol 无机磷的量定义为一个酶活力单位。

$$\text{ACC(U}/10^4) = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{反总}} \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 10 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N$$

● 按液体体积计算

酶活单位定义：每毫升液体每小时产生 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{ACC(U/mL)} = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 10 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$$

$C_{\text{标准}}$ ：标准溶液的浓度，0.5 $\mu\text{mol/mL}$ ； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，0.1 mL； $V_{\text{样}}$ ：加入的样本体积，0.01 mL； $V_{\text{样总}}$ ：提取液体积，1 mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；T：反应时间，30 min=0.5 h；N：细胞数量，以 10^4 为单位（例如细胞数量为 5×10^6 ， $N=500$ ）；W：样本质量，g。

07 结果展示

示例-1：取 0.112 g 胡萝卜，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.609 - 0.117 = 0.492$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.309 - 0.043 = 0.266$ 。按样本质量计算得： $\text{ACC(U/g)} = 10 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W = 165.145 \text{ U/g}$ 。

08 FAQ

● 检测得到的样本 $\Delta A_{\text{测定}}$ 过高或者过低怎么办？

如果 $\Delta A_{\text{测定}}$ 小于 0.04 可适当加大样本量。如果 $\Delta A_{\text{测定}}$ 大于 1.5，样本可用 Extraction Buffer 进一步稀释，或减少提取用样本量，再重新进行测定。

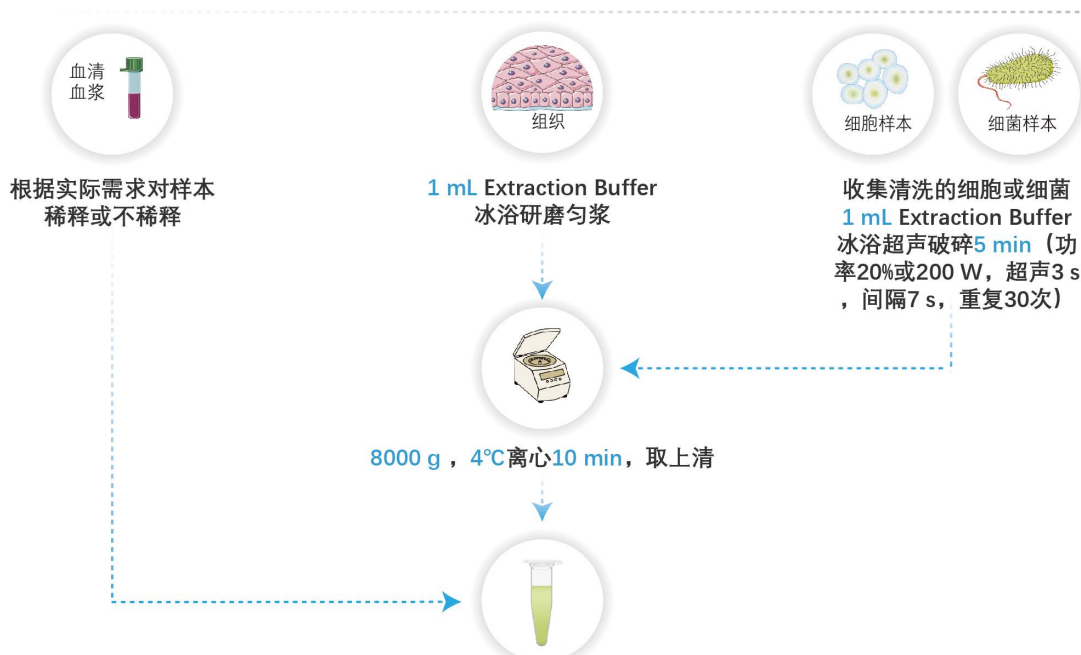
09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB3030	CheKine™ 乙醇脱氢酶（ADH）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1560	CheKine™ 酰基转移酶（AAT）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1270	CheKine™ 丙酮酸脱氢酶（PDH）活性检测试剂盒（微量法）

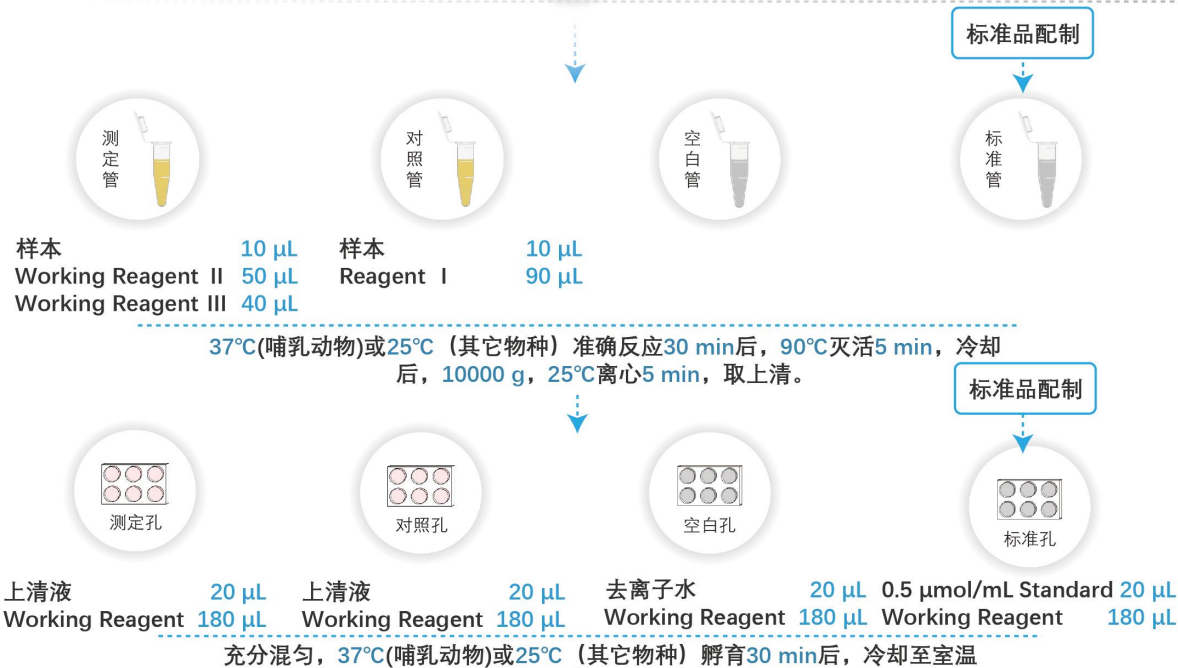
CheKine™ 乙酰辅酶A羧化酶（ACC）活性检测流程示意图

(Abbkin 货号：KTB1261)

样本处理



体系配置



数据检测

测定660 nm吸光度
结果计算