

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ169

产品规格：96T(40 samples)

检测仪器：酶标仪(650-670 nm)

Elabscience® 乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)比色法测试盒

Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动、植物组织样本中的乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)的酶活。

检测原理

乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)是脂肪酸合成代谢中的关键酶，它催化乙酰辅酶 a 生成丙二酰单酰辅酶 A, 后者是脂肪酸合成中二碳单位的供体, 因此 ACC 也成为脂肪酸合成代谢中的限速酶，被广泛应用于转基因油料作物研究中。

ACC 催化乙酰辅酶 A、NaHCO₃、ATP 生成无机磷，通过检测无机磷含量变化来表示酶活高低。

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 GBQ162)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 (Size)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	缓冲液 (Buffer Solution)	30 mL×1 瓶	-20℃ 保存 3 个月
试剂二 (Reagent 2)	底物 A (Substrate A)	粉剂×2 瓶	-20℃ 避光 保存 3 个月
试剂三 (Reagent 3)	阴性对照液(Negative Control Solution)	3.5 mL×1 瓶	-20℃ 保存 3 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 B (Substrate B)	3.5 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 3 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 A (Chromogenic Agent A)	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 3 个月
试剂六 (Reagent 6)	显色剂 B (Chromogenic Agent B)	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 3 个月
试剂七 (Reagent 7)	酸性液 (Acid Solution)	1.8 mL×1 支	-20℃ 保存 3 个月
试剂八 (Reagent 8)	500 μmol/L 标准品 (500 μmol/L Standard Solution)	6 mL×1 瓶	-20℃ 保存 3 个月
	96 孔酶标板	96 孔×1 块	无要求

	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(650-670 nm，最佳检测波长 660 nm)，水浴锅，37℃ 恒温箱。

试剂：双蒸水、生理盐水（0.9%NaCl）

试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液的配制：

每瓶试剂二加入5 mL双蒸水溶解得到试剂二工作液，分装后-20℃可避光保存7天。

③ 试剂五工作液的配制：

取一支试剂五加入1 mL双蒸水溶解，2-8℃避光保存7天。

④ 试剂六工作液的配制：

取一支试剂六加入1 mL双蒸水混匀溶解，2-8℃避光保存7天，如有固体不溶，可90-100℃水浴溶解。

⑤ 定磷剂的配制：

按双蒸水：试剂五工作液：试剂六工作液：试剂七体积比=2：1：1：1进行配制，配制完成的定磷剂应为淡黄色，若为其他颜色，应排除磷污染因素后重新配制，配制后避光，按需配制，现配现用。

⑥ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(μmol/L)	0	100	150	200	300	400	450	500
试剂八(μL)	0	40	60	80	120	160	180	200
双蒸水(μL)	200	160	140	120	80	40	20	0

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照组织样本质量(g)：生理盐水(0.9%NaCl)体积(mL) = 1: 9 的比例匀浆，4℃，10000 × g离心10 min，取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：1.86-138 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%绿萝叶片组织	不稀释	10%小鼠肾组织	不稀释
10%大鼠肝组织	不稀释	10%土豆组织	不稀释

注：稀释液为生理盐水(0.9%NaCl)。

实验关键点

- ① 配制定磷剂时，可选用玻璃容器配制，玻璃容器使用前反复刷洗后，用双蒸水反复冲洗。配制好的定磷剂应为淡黄色，如果是绿色或者蓝色，则配制过程中有磷污染，需要重新配制。
- ② 操作步骤中，小心吸取上清进行测定，请勿吸取到沉淀。
- ③ 实验时小心操作，防止外部磷污染。

操作步骤

酶促反应：

- ① 1.5 mL EP 管设置对照管和测定管，各对照管和测定管中加入 200 μL 试剂一；
- ② 向①中各对照管和测定管加入 50 μL 试剂二工作液；
- ③ 向②中各对照管加入 40 μL 试剂三，各测定管加入 40 μL 试剂四；
- ④ 向③中各对照管和测定管加入 40 μL 待测样本，混匀，37°C 孵育 30 min。
- ⑤ 95°C 水浴 5 min，8000 $\times$ g 离心 5 min，取上清待测。

显色反应：

- ① 酶标板设置标准孔，对照孔和测定孔；
- ② 标准孔加 80 μL 不同浓度标准品溶液，对照孔加 80 μL 对照管上清，测定孔加 80 μL 测定管上清；
- ③ 向②中各孔加入 50 μL 定磷剂，振板 5 s，37°C 避光孵育 10 min，酶标仪 660 nm 波长下检测各孔吸光度。

操作表

酶促反应：

	测定管	对照管
试剂一(μL)	200	200
试剂二工作液(μL)	50	50
试剂三(μL)	--	40
试剂四(μL)	40	--
待测样本(μL)	40	40
混匀，37℃ 孵育 30 min。		
95℃ 水浴 5 min，8000 × g 离心 5 min，取上清待测。		

显色反应：

	标准孔	测定孔	对照孔
不同浓度标准品(μL)	80	--	--
测定管上清(μL)	--	80	--
对照管上清(μL)	--	--	80
定磷剂(μL)	50	50	50
振板 5 s，37℃ 孵育 10 min，酶标仪 660 nm 波长下检测各孔吸光度。			

本试剂盒检测组织样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 GBQ162)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

组织样本中乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)计算公式:

酶活定义:37°C 条件下, 每克组织蛋白每分钟水解底物的过程生成 1 μmol

无机磷所需要的 ACC 酶量为一个活力单位。

$$\text{ACC 活力 (U/gprot)} = (\Delta A_{660} - b) \div a \div T \times \frac{V_1}{V_2} \div C_{\text{pr}} \times f$$

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA_{660} : 测定孔 OD 值-对照孔 OD 值

T: 酶促反应时间, 30 min

V_1 : 酶促反应总体积, 0.33 mL

V_2 : 酶促反应中加入样本的体积, 0.04 mL

C_{pr} : 组织样本的蛋白浓度, gprot/L

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

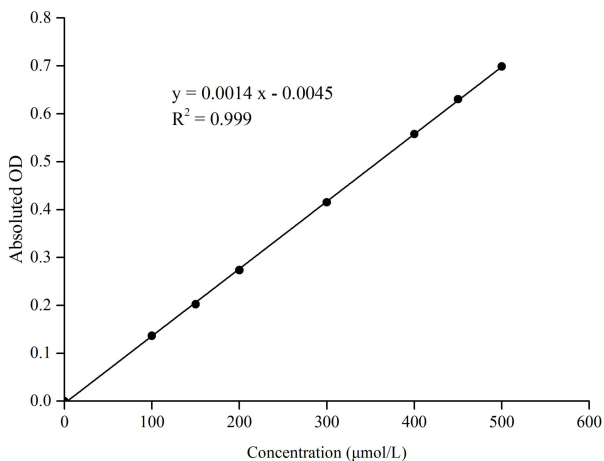
检测范围	6.78-138 U/L	平均批间差	8.0 %
灵敏度	6.78 U/L	平均批内差	4.0 %
平均回收率	98 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量80 μL , 按照操作步骤进行实验, OD值如下表所示:

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	100	150	200	300	400	450	500
OD 值	0.040	0.181	0.243	0.315	0.452	0.596	0.670	0.733
	0.040	0.172	0.242	0.312	0.458	0.599	0.671	0.744
平均 OD 值	0.040	0.177	0.243	0.314	0.455	0.598	0.671	0.739
绝对 OD 值	0.000	0.137	0.203	0.274	0.415	0.558	0.631	0.699

② 绘制标曲(如下图):



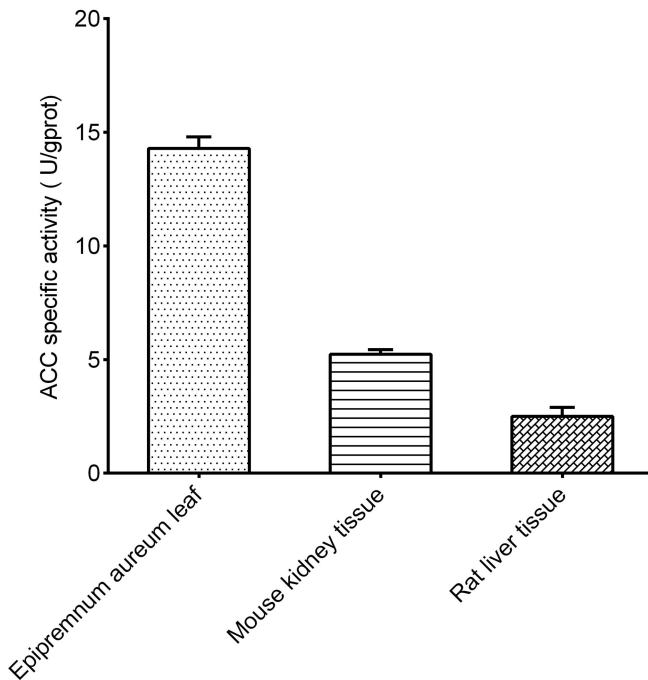
附录2 实例分析

例如检测绿萝叶片组织样本(数据仅供参考):

取 10%绿萝叶片组织匀浆上清液 40 μL , 按操作表操作, 结果如下: 标准曲线: $y = 0.0014x - 0.0045$, 对照孔 OD 值为 0.099, 测定孔 OD 为 0.188, $\Delta A_{660} = 0.188 - 0.099 = 0.089$, 10%绿萝叶片组织的蛋白浓度为 1.26 gprot/L 计算结果为:

$$\text{ACC 酶活 (U/gprot)} = (0.089 + 0.0045) \div 0.0014 \div 30 \times \frac{0.33}{0.04} \div 1.26 = 14.57 \text{ U/gprot}$$

按说明书操作, 测定 10%绿萝叶片组织(蛋白浓度为 1.26 gprot/L, 加样量 40 μL)、10%小鼠肾组织(蛋白浓度为 6.98 gprot/L, 加样量 40 μL)、10%大鼠肝组织(蛋白浓度为 6.68 gprot/L, 加样量 40 μL)的 ACC 酶活(如下图):



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

