

脂酰辅酶A合成酶(ACS)活性检测试剂盒（微量法）

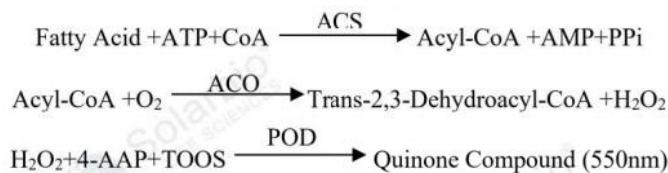
产品货号：BA3494

产品规格：100T/96S

产品简介：

脂酰CoA合成酶(Acyl-CoA Synthetase, ACS;EC6.2.1.3)是脂肪酸代谢中的关键酶，通过消耗ATP催化脂肪酸与辅酶A结合生成活化的脂酰CoA。该酶是脂肪酸 β -氧化的起始步骤，活化的脂酰CoA需通过肉毒碱转运系统进入线粒体基质进行后续分解。在肝脏中，活化的脂酰CoA既可作为能量代谢底物参与 β -氧化，也可作为甘油三酯和磷脂的合成前体。

在ATP和Mg²⁺存在的条件下，脂酰CoA合成酶催化脂肪酸与辅酶A结合生成脂酰CoA，脂酰CoA在脂酰辅酶A氧化酶(Acyl-CoAOxidase, ACO)催化下生成过氧化氢，过氧化氢和4-AAP、TOOS在过氧化物酶的作用下生成紫红色产物，在550nm处有特征吸收峰，据此可以计算ACS活性。



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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品内容：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体110mL×1瓶	2-8°C
试剂一	液体13mL×1瓶	2-8°C
试剂二	粉剂×1瓶	-20°C
试剂三	粉剂×1瓶	-20°C
试剂四	粉剂×1瓶	2-8°C
试剂五	粉剂×1支	-20°C
试剂六	液体4mL×1瓶	2-8°C
试剂七	液体1.3mL×1支	2-8°C
试剂八	液体2.5mL×1瓶	2-8°C
标准品	液体0.15mL×1支	2-8°C

溶液的配制：

- 试剂二：试剂置于试剂瓶内棕色玻璃瓶中，临用前加入2.575mL蒸馏水充分溶解，用不完的试剂4°C保存4周，避免反复冻融。
- 试剂三：试剂置于试剂瓶内棕色玻璃瓶中，临用前加入2.5mL蒸馏水充分溶解，用不完的试剂-20°C保存4周，避免反复冻融。
- 试剂四：试剂置于试剂瓶内棕色玻璃瓶中，临用前加入2.715mL丙酮充分溶解，用不完的试剂用封口膜封口在4°C保存8周，防止挥发。
- 试剂五：临用前加入1.3mL蒸馏水充分溶解，用不完的试剂4°C分装保存4周，避免反复冻融。
- 试剂八：若有析出，可置于40°C水浴至澄清透明后使用。
- 标准品：5μmol/mL棕榈酰CoA标准品，临用前先用掌上离心机将溶液离心至底部。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物技术有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

QQ：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

7. 工作液配制：临用前根据样本量按照试剂一:试剂二:试剂三:试剂四:试剂五:试剂六:试剂七=100 μ L: 20 μ L: 20 μ L: 20 μ L: 10 μ L: 30 μ L: 10 μ L(共 210 μ L, 约 1T)的比例配制成工作液, 现配现用, 3 小时内用完。

所需的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调式移液器、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵匀浆器/细胞超声破碎仪、丙酮(>98%, AR)、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献) :

- 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)加入提取液, 冰浴匀浆后, 12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清液置于冰上待测。
- 细胞/细菌: 按照细胞数量(10^7 个): 提取液体积(mL)为 5~10:1 的比例(建议 1 千万细胞加入 1mL 提取液), 冰浴超声波破碎细胞(功率 200w, 超声 3 秒, 间隔 10 秒, 总时间 3min); 12000rpm, 4°C 离心 10min, 取上清置冰上待测。
- 血清/血浆等液体: 直接测定, 若有浑浊, 离心后进行测定。

注: 高脂类样本建议用滤膜过滤后进行测定。

二、测定步骤

- 可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 550nm, 可见分光光度计用蒸馏水调零。
- 实验前将工作液常温至平衡。
- 标准品的稀释: 将 5 μ mol/mL 棕榈酰 CoA 标准品用蒸馏水进行稀释得到 2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078125 μ mol/mL 的标准品备用。
- 标准品稀释表:

序号	稀释前浓度 (μ mol/mL)	标准品体积 (μ L)	蒸馏水体积 (μ L)	稀释后浓度 (μ mol/mL)
1	5	50	50	2.5
2	2.5	50	50	1.25
3	1.25	50	50	0.625
4	0.625	50	50	0.3125
5	0.3125	50	50	0.15625
6	0.15625	50	50	0.078125

备注: 实验中每个标准管需 20 μ L 标准品(注意不要在此处测定吸光值)

- 操作表(在 1.5mL EP 管中依次加入以下试剂):

试剂名称 (μ L)	测定管	标准管	空白管
样本	20	-	-
标准品	-	20	-
蒸馏水	-	-	20
工作液	210	210	210
充分混匀, 37°C准确反应 10min, 立即加入以下试剂			
试剂八	20	20	20
充分混匀, 常温 5000rpm 离心 5min, 吸取 200 μ L 上清液在 550nm 处测定吸光度 A, 分别记为 A 测定、A 标准、A 空白, 计算 ΔA 测定=A 测定-A 空白, ΔA 标准=A 标准-A 空白。(空白管和标准曲线只需测 1-2 次)。			



扫一扫 加微信

上海尚宝生物技术有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>

注: 37°C 反应时间需准确, 若样本量过多, 建议分批次进行测定。

三、脂酰辅酶A合成酶(ACS)活性计算

1. 标准曲线的绘制

根据标准管的浓度(x, $\mu\text{mol}/\text{mL}$)和吸光度 ΔA 标准(y, ΔA 标准), 建立标准曲线。根据标准曲线, 将 ΔA 测定(y, ΔA 测定)带入公式计算样本浓度(x, $\mu\text{mol}/\text{mL}$)。

2. 脂酰辅酶 A 合成酶(ACS)活性计算:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 在反应体系中, 每分钟每mg蛋白产生1 μmol 棕榈酰CoA定义为一个酶活单位。

$$\text{ACS活性}(\text{U}/\text{mg prot}) = x \times V \text{提取} \div (Cpr \div V \text{提取}) \div T \times F = x \div Cpr \div 10 \times F$$

(2) 按样本质量计算:

酶活定义: 在反应体系中, 每分钟每g组织产生1 μmol 棕榈酰CoA定义为一个酶活单位。

$$\text{ACS活性}(\text{U}/\text{g 质量}) = x \times V \text{提取} \div W \div T \times F = x \div W \div 10 \times F$$

(3) 按细胞数量计算:

酶活定义: 在反应体系中, 每分钟每 10^7 个细胞产生1 μmol 棕榈酰CoA定义为一个酶活单位。

$$\text{ACS活性}(\text{U}/10^7\text{cell}) = x \times V \text{提取} \div N \div T \times F = x \div N \div 10 \times F$$

(4) 按照液体体积计算:

酶活定义: 在反应体系中, 每分钟每mL液体产生1 μmol 棕榈酰CoA定义为一个酶活单位。

$$\text{ACS活性}(\text{U}/\text{mL}) = x \div T \times F = x \div 10 \times F$$

V提取: 加入的提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 10min; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL ; W: 样本质量, g; N: 细胞数量, 以 10^7 计; F: 样本稀释倍数。

注意事项:

- 若 ΔA 测定大于 1, 可用蒸馏水稀释样本后测定。
- 若 ΔA 测定小于 0.005, 可适当增大样本量同时减小工作液中试剂一体积后测定, 注意同步修改计算公式, 此时稀释倍数 F=V 标准/V 实际(V 标准: 加入反应体系的标准品体积, 20 μL ; V 实际: 实际加入反应体系的样本体积, μL)。举例: 样本量增大至 40 μL , 此时按照样本质量计算公式为 ACS 活性($\text{U}/\text{g 质量}$)= $x \times V \text{提取} \div W \div T \times F = x \div W \div 10 \times 0.5$ 。

实验实例:

- 取 5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 棕榈酰 CoA 标准品, 稀释至 2.5、1.25、0.625、0.3125、0.15625、0.078125 $\mu\text{mol}/\text{mL}$, 按操作表检测各标准管吸光值, 根据各标准管吸光值建立标准曲线 $y=0.2757x-0.0515$, $R^2=0.9958$ 。
- 不同类型样本检测结果如下:

样本	质量/细胞数量/体积	样本量	A测定	A空白	ΔA	ACS活性	单位
大鼠肝脏	0.1050g	20 μL	0.335	0.055	0.280	1.145	U/g质量
花生	0.1056g	40 μL	0.185	0.055	0.130	0.312	U/g质量
猪血清	直接测	40 μL	0.096	0.055	0.041	0.017	U/mL

注:

- 上述实验中使用 96 孔板进行测定。
- 样本加 1mL 提取液提取。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物技术有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱:saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com