

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0666

Size: 50T/48S

乙酰辅酶 A 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义：

乙酰辅酶 A 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中。是生物体能源物质代谢过程中产生的一种重要的中间代谢产物。在体内能源物质代谢中是一个枢纽性的物质。糖、脂肪、蛋白质三大营养物质通过乙酰辅酶 A 汇聚成一条共同的代谢通路-三羧酸循环和氧化磷酸化，经过这条通路彻底氧化生成二氧化碳和水，释放能量用于 ATP 合成。此外，乙酰辅酶 A 是合成脂肪酸，酮体，胆固醇及其衍生物等生理活性物质的前体物质。

二、测定原理：

苹果酸脱氢酶可催化苹果酸和 NAD 生成草酰乙酸和 NADH。柠檬酸合酶可催化乙酰辅酶 A 和草酰乙酸生成柠檬酸和辅酶 A。利用苹果酸脱氢酶和柠檬酸合酶的偶联反应，乙酰辅酶 A 含量和 NADH 的生成速率成正比，340nm 下吸光值的上升速率反应了乙酰辅酶 A 含量的高低。

三、需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 50mL × 1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 × 1 支	-20℃保存	临用前加入 500μL 试剂五充分溶解备用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
试剂三	液体 20μL × 1 支	4℃保存	临用前加入 500μL 试剂五充分溶解备用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
试剂四	粉剂 × 1 瓶	-20℃保存	临用前加入 45mL 试剂五充分溶解备用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。
试剂五	液体 60mL × 1 瓶	4℃保存	
工作液的配制：临用前请根据拟用工作液体积（样本数×0.92mL），将试剂二、三和四按照 1:1:90 的比例混合，或者直接把试剂二和试剂三加入到试剂四中混匀（可以测定 48 样）；加样前置 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴锅中预热 30 min；现配现用；			

五、操作步骤：

● 乙酰辅酶 A 的提取

1、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000:1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1:5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一），进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

● 测定步骤

1、分光光度计预热 30min，用蒸馏水于 340nm 处调零。

2、取 920μL 工作液和 100μL 样本至 1mL 石英比色皿，混匀，立即记录 340nm 处 20s 的吸光值 A1 和 80s 时的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

六、乙酰辅酶 A 含量计算

标准条件下测定的回归方程为 $y = 1640x + 0.012$; x 为吸光值, y 为标准品浓度 (nmol/mL) 注意: 本试剂盒最低检测限为 1.6nmol/mL。

1. 按照蛋白浓度计算

$$\text{乙酰辅酶 A 含量 (nmol/mg prot)} = [(1640 \times \Delta A + 0.012) \times V1] \div (V1 \times Cpr)$$

$$= (1640 \times \Delta A + 0.012) \div Cpr$$

需要另外测定, 建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒 (ZC-S0470)。

2. 按照样本质量计算

$$\text{乙酰辅酶 A 含量 (nmol/g 鲜重)} = [(1640 \times \Delta A + 0.012) \times V1] \div (W \times V1 \div V2)$$

$$= (1640 \times \Delta A + 0.012) \div W$$

(3) 按照细菌或细胞密度计算:

$$\text{乙酰辅酶 A 含量 (nmol/10}^4\text{)} = [(1640 \times \Delta A + 0.012) \times V1] \div (500 \times V1 \div V2)$$

$$= (1640 \times \Delta A + 0.012) \div 500$$

$V1$: 加入反应体系中样本体积, 0.1mL; $V2$: 加入提取液体积, 1 mL; Cpr : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。