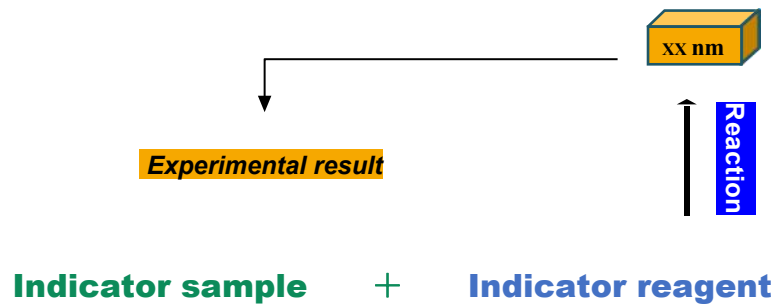


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 含量测定试剂盒说明书

微量法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

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。

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。

需自备的仪器和用品

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板（UV板）、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存	临用前加入250 μL试剂五充分溶解备用；用不完的试剂 4℃保存一周
试剂三	液体×1 支	4℃保存	临用前加入250 μL试剂五充分溶解备用；用不完的试剂 4℃保存一周
试剂四	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前加入22.5mL试剂五充分溶解备用；用不完的试剂 4℃保存一周
试剂五	液体 30mL×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×0.23 mL），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96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；

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 1 mL 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°C 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 1 mL 试剂一)，进行冰浴匀浆。8000g 4°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min，用蒸馏水于 340nm 处调零。
- 2、将工作液置 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴锅中预热 10min。
- 3、取 25 μ L 样本和 230 μ L 工作液至微量石英比色皿或者 96 孔板 (UV 板)，混匀，立即记录 340nm 处 20s 的吸光值 A1 和 80s 时的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

乙酰辅酶 A 含量计算

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

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 1.6 nmol/mL。

(1) 按照蛋白浓度计算

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

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

(2) 按照样本质量计算

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

(3) 按照细菌或细胞密度计算：

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

V1: 加入反应体系中样本体积，0.025 mL；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。

b. 使用 96 孔板 (UV 板) 测定的计算公式如下：

标准条件下测定的回归方程为 $y = 3280x + 0.024$ ；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 1.6 nmol/mL。

(1) 按照蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{乙酰辅酶A含量 (nmol/mg prot)} &= [(3280 \times \Delta A + 0.024) \times V1] \div (V1 \times Cpr) \\ &= (3280 \times \Delta A + 0.024) \div Cpr \end{aligned}$$

需要另外测定，建议使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

(2) 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{乙酰辅酶A含量 (nmol/g 鲜重)} &= [(3280 \times \Delta A + 0.024) \times V1] \div (W \times V1 \div V2) \\ &= (3280 \times \Delta A + 0.024) \div W \end{aligned}$$

(3) 按照细菌或细胞密度计算:

$$\begin{aligned}\text{乙酰辅酶 A 含量 (nmol/10}^4\text{)} &= [(3280 \times \Delta A + 0.024) \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) \\ &= (3280 \times \Delta A + 0.024) \div 500\end{aligned}$$

V1: 加入反应体系中样本体积, 0.025mL; 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。