

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含量检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

产品内容：

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	-
<p>工作液的配制：临用前请根据拟用工作液体积（样本数×0.92 m L），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；</p>			

产品说明：

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。

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、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。

操作步骤:

一、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°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 1mL 试剂一), 进行冰浴匀浆。8000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

二、测定步骤

1、分光光度计预热 30min, 用蒸馏水于 340nm 处调零。

2、取 920 μ L 工作液和 100 μ L 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 $\Delta A=A2-A1$ 。

三、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

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。

2 按照样本质量计算

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:

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

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。