

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

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

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×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×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 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24样）；加样前置37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴锅中预热30 min；用不完的试剂4℃保存一周</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℃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。

### 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  $\mu$ L工作液和100  $\mu$ 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

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

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：

$$\begin{aligned} \text{乙酰辅酶A 含量 (nmol/104)} &= [(1640 \times \Delta A + 0.012) \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) \\ &= (1640 \times \Delta A + 0.012) \div 500 \end{aligned}$$

V1：加入反应体系中样本体积，0.1mL；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