

乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 含量测定试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注 意：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、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

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 250μL 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 10uL×1 支，4℃ 保存。临用前加入 250μL 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 22.5mL 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 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 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、分光光度计或酶标仪预热 30min, 用蒸馏水于 340nm 处调零。
- 2、将工作液置 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴锅中预热 10 min。
- 2、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, 混匀, 立即记录 340nm 处 20s 的吸光值 A1 和 80s 时的吸光值 A2, 计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

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 1.6nmol/mL。

(1) 按照蛋白浓度计算

乙酰辅酶 A 含量(nmol/mg prot)=[(1640 \times ΔA +0.012) \times V1] \div (V1 \times Cpr)=(1640 \times ΔA +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 ΔA +0.012) \times V1] \div (W \times V1 \div V2)=(1640 \times ΔA +0.012) \div W

(3) 按照细菌或细胞密度计算:

乙酰辅酶 A 含量(nmol/10⁴)=[(1640 \times ΔA +0.012) \times V1] \div (500 \times V1 \div V2)=(1640 \times ΔA +0.012) \div 500

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。

b.使用 96 孔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 1.6nmol/mL。

(1) 按照蛋白浓度计算

乙酰辅酶 A 含量(nmol/mg prot)=[(3280 \times ΔA +0.024) \times V1] \div (V1 \times Cpr)=(3280 \times ΔA +0.024) \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)=[(3280 \times ΔA +0.024) \times V1] \div (W \times V1 \div V2)=(3280 \times ΔA +0.024) \div W

(3) 按照细菌或细胞密度计算:

乙酰辅酶 A 含量 (nmol/10⁴)=[(3280 \times ΔA +0.024) \times V1] \div (500 \times V1 \div V2)=(3280 \times ΔA +0.024) \div 500

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。
