

乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-S009-48 微板法 48 样)

一、指标介绍:

乙酰辅酶 A 是能源物质代谢的重要中间代谢产物, 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, 释放能量用以 ATP 的合成。它也是合成脂肪酸、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 的生成量成正比, 340nm 下吸光值的上升量反应了乙酰辅酶 A 含量的高低。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 10mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉体 1 瓶	-20°C 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 4.5mL 试剂一溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉体 1 瓶	4°C 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 4.5mL 试剂一溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	粉体 1 支	-20°C 保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 0.6mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织样本, 加 1mL 的提取液, 进行冰浴匀浆, 粗提液全部转移到 EP 管中, 12000rpm, 4°C 离心 10min, 上清液待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量(g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例提取

② 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

③ 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液; 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); 12000rpm 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。(或按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 1000~2000: 1 的

比例进行提取)

【注】：若增加样本量，可按细菌/细胞数量 (10^4 个)：提取液 (mL) 为 1000~5000：1 的比例进行提取。

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min (等仪器过自检程序亦可)，设定波长至 340nm。
- ② 试剂解冻至室温 (25℃)，在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管
样本	20
试剂二	85
试剂三	85
混匀，室温 (25℃) 下，5min 后于 340nm 处读取 A1 值。	
试剂四	10
混匀，室温 (25℃) 下，反应 20min 后于 340nm 处读取吸光值 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】若 ΔA 差值较小如小于 0.005，可增加样本取样质量 W，如增至 0.2g 或更多，或增加样本加样量 V1 (如增至 40μL 或更多，则试剂二和三分别减少 10μL 相应减少)，则改变后的 V1 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算：

1、按照样本质量计算：

$$\text{乙酰辅酶 A 含量 (nmol/g 鲜重)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) = 3215 \times \Delta A \div W$$

2、按样本蛋白浓度计算：

$$\text{乙酰辅酶 A 含量 (nmol/mg prot)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) = 3215 \times \Delta A \div Cpr$$

3、按液体体积计算：

$$\text{乙酰辅酶 A 含量 (nmol/mL)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div V1 = 3215 \times \Delta A$$

4、按细菌/细胞密度计算：

$$\text{乙酰辅酶 A 含量 (nmol/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) = 3215 \div 500 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数，6220 L/mol/cm；

d---96 孔板光径，0.5cm；

V---提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，20μL=0.02mL；

V2---反应体系总体积，200μL=2×10⁻⁴L；

W---样品质量，g。

500---细胞或细菌总数，500 万。

W---样本质量，g；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。