

乙酰辅酶A (Acetyl-CoA) 含量测定试剂盒说明书

微量法 100管/96样

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（10⁴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25μL样本和230μL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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

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1.6nmol/mL。

(1) 按照蛋白浓度计算

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

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

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

(3) 按照细菌或细胞密度计算：

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

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

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

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

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

(3) 按照细菌或细胞密度计算：

$$\text{乙酰辅酶A含量 (nmol/104)} = [(3280 \times \Delta A + 0.024) \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) = (3280 \times \Delta A + 0.024) \div 500$$

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。