

乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 含量检测试剂盒 (微量法)
(本试剂盒仅供科研使用)**产品包装**

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0214	乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 含量检测试剂盒	100 管/96 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 100mL ×1 瓶	4℃
试剂二	粉剂×1 支: 临用前加入 250μL 试剂五充分溶解备用; 用不完的试剂 4℃保存一周	-20℃
试剂三	液体×1 支: 临用前加入 250μL 试剂五充分溶解备用; 用不完的试剂 4℃保存一周	4℃
试剂四	粉剂×1 瓶: 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	-20℃
试剂五	液体 30mL ×1 瓶	4℃
工作液的配制: 临用前请根据拟用工作液体积 (样本数×0.23mL), 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 30min; 现配现用。		

一、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。

二、自备材料

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。

三、样本准备:

- 1、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。
- 2、细菌或细胞: 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。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、将工作液置 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴锅中预热 10min。
- 3、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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

五、含量的计算

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)。

- 1、按照组织样本蛋白浓度计算:

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

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、按照组织样本鲜重计算

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

- 3、按照细菌/细胞密度计算:

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

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。

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)。

- 1、按照组织样本蛋白浓度计算

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

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

- 2、按照组织样本鲜重计算

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

- 3、按照细菌/细胞密度计算

$$\text{乙酰辅酶 A 含量 (nmol/10}^4\text{)} = [(3280 \times \Delta A + 0.024) \times V1] \div (500 \times V1 \div V2) \\ = (3280 \times \Delta A + 0.024) \div 500。$$

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。

六、注意事项

- 1、本试剂盒最低检测限为 1.6nmol/mL。