

乙酰辅酶 A 含量检测试剂盒说明书

Acetyl coenzyme A (Acetyl Co-A) Assay Kit

微量法

货号: AK341

规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK341-A	100ml×1 瓶	4℃保存;
AK341-B	粉剂×1 支	4℃保存。临用前加入250μLAK341-E 充分溶解备用; 用不完的试剂4℃保存 3 天;
AK341-C	10ul×1 支	4℃保存。临用前加入 250μl AK341-E 充分溶解备用; 用不完的试剂4℃保存 3 天;
AK341-D	粉剂1 瓶	-20℃保存。临用前加入 22.5ml AK341-E 充分溶解备用; 用不完的试剂4℃保存 3 天;
AK341-E	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 AK341-B, C, D 按照 1:1:90的比例混合, 或者直接把AK341-B 和 AK341-C 加入到 AK341-D 中混匀; 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。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 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。

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。

自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、天平、低温离心机、恒温水浴锅、微量石英比色皿/96 孔板 (UV板)、研钵/匀浆器、冰、蒸馏水。

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): AK341-A 体积(mL)为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL AK341-A), 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): AK341-A 体积(mL)为1: 5~10 的比例 (建议称取约0.1g 组织, 加入1mL AK341-A), 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/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。
3. 取 25μL 样本和230μl 工作液至石英比色皿或者96 孔板中, 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:

(1) 按照样本质量计算

$$\text{乙酰辅酶 A 含量(nmol/g 鲜重)}=(\Delta A \div \epsilon \div d) \times V_{\text{反}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \times V_{\text{提}} \div W \times F=1639.87 \times \Delta A \div W \times F$$

(2) 按照细菌或细胞数量计算

$$\text{乙酰辅酶 A 含量(nmol/10}^4\text{)}=(\Delta A \div \epsilon \div d) \times V_{\text{反}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \times V_{\text{提}} \div 500 \times F=3.28 \times \Delta A \times F$$

注: ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$; $V_{\text{反}}$: 反应总体积, 2.55×10^{-4} L; $V_{\text{样}}$: 加入样本上清体积, 0.025mL; $V_{\text{提}}$: 加入提取液的体积, 1mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌数量, 500 万; F: 稀释倍数。

b. 使用96 孔板测定的计算公式如下:

(1) 按照样本质量计算

$$\text{乙酰辅酶 A 含量(nmol/g 鲜重)}=(\Delta A \div \epsilon \div d) \times V_{\text{反}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \times V_{\text{提}} \div W \times F=3279.74 \times \Delta A \div W \times F$$

(2) 按照细菌或细胞数量计算

$$\text{乙酰辅酶 A 含量(nmol/10}^4\text{)}=(\Delta A \div \epsilon \div d) \times V_{\text{反}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \times V_{\text{提}} \div 500 \times F=6.56 \times \Delta A \times F$$

注: ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d: 比色皿光径, 0.5cm; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$; $V_{\text{反}}$: 反应总体积, 2.55×10^{-4} L; $V_{\text{样}}$: 加入样本上清体积, 0.025mL; $V_{\text{提}}$: 加入提取液的体积, 1mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌数量, 500 万; F: 稀释倍数。

注意事项:

1. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴乳胶手套操作。
2. 粉剂-20℃保存, 配制好的试剂 3 天内使用完。