

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 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。