

乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 含量测定试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、产品简介:

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:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	-20℃保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 17mL 试剂一溶解备用。
试剂三	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部, 再加 17mL 试剂一溶解备用。
试剂四	粉体 mg×1 支	-20℃保存	使用前甩几下使试剂落入底部, 再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿 (光径 1cm)、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、乙酰辅酶 A 含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

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℃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 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; 取约 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 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量(10^4): 提取液(mL)为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

① 紫外分光光度计预热 30min, 设定波长至 340nm, 蒸馏水调零。

② 试剂解冻至室温 (25℃), 在 1mL 石英比色皿 (光径 1cm) 中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	80
试剂二	310
试剂三	310
混匀, 室温 (25°C) 下, 5min 后于 340nm 处读取 A1 值。	
试剂四	20
混匀, 室温 (25°C) 下, 反应 10min 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 150μL 或更多, 则试剂三相应减少), 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:

$$\text{乙酰辅酶 A 含量(nmol/g 鲜重)}=[\Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V)=1607.7 \times \Delta A \div W$$

2、按细胞数量计算:

$$\text{乙酰辅酶 A 含量(nmol/10}^4 \text{ cell)}=[\Delta A \div \varepsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V)=3.22 \times \Delta A$$

ε ---NADH 摩尔消光系数, 6220 L/mol/cm;

V---提取液体积, 1 mL;

V2---反应体系总体积, 800μL=8×10⁻⁴L;

500---细胞数量, 万。

d---光径, 1cm;

V1---加入样本体积, 80μL=0.08mL;

W---样品质量, g;