

使用说明书

Instruction Manual

乙酰辅酶 A 含量检测试剂盒（微量法）

Acetyl coenzyme A (Acetyl Co-A) Assay Kit (Microanalysis)

产品描述

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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

100T/96S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0007M-A	100mL×1 瓶	4℃保存。
CB0007M-B	粉剂×1 支	4℃保存。临用前加入 250μL CB0007M-E 充分溶解备用；用剩的试剂 4℃保存 3 天。
CB0007M-C	10μL×1 支	4℃保存。临用前加入 250μL CB0007M-E 充分溶解备用；用剩的试剂 4℃保存 3 天。
CB0007M-D	粉剂 1 瓶	-20℃保存。临用前加入 22.5mL CB0007M-E 充分溶解备用；用剩的试剂 4℃保存 3 天。
CB0007M-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 CB0007M-B, C, D 按照 1:1:90 的比例混合，或者直接把 CB0007M-B 和 CB0007M-C 加入到 CB0007M-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。		

操作说明

一、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。

二、乙酰辅酶A 的提取：

- 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)：CB0007M-A 体积(mL)为 500-1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL CB0007M-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。
- 组织：按照组织质量(g)：CB0007M-A 体积(mL)为1:5-10 的比例(建议称取约0.1g 组织，加入1mL CB0007M-A)，进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

三、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. 将工作液置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

四、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，1mol= 10^9 nmol；V 反：反应总体积， 2.55×10^{-4} L；V 样：加入样本上清体积，0.025mL；V 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，1mol= 10^9 nmol；V 反：反应总体积， 2.55×10^{-4} L；V 样：加入样本上清体积，0.025mL；V 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. 粉剂 -20°C 保存，配制好的试剂 3 天内使用完。
2. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
3. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

