

## 乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 含量测定试剂盒说明书

(微板法 96 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  $\text{NAD}^+$  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 100mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉体 mg×1 瓶	-20°C 保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 9mL 试剂一溶解备用。
试剂三	粉体 mg×1 瓶	4°C 保存	使用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 9mL 试剂一溶解备用。
试剂四	粉体 mg×1 支	-20°C 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:

酶标仪、96 孔板、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°C 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°C 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 酶标仪预热 30min,设定波长至 340nm。

② 试剂解冻至室温(25°C),在 96 孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂二	85
试剂三	85
混匀, 室温 (25°C) 下, 5min 后于 340nm 处读取 A1 值。	
试剂四	10
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  $\Delta A$  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 60μL 或更多, 则试剂二和三分别减少 20μL 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:

$$\text{乙酰辅酶 A 含量(nmol/g 鲜重)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) = 3215 \times \Delta A \div W$$

### 2、按细胞数量计算:

$$\text{乙酰辅酶 A 含量(nmol/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) = 6.43 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---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, 200μL=2×10<sup>-4</sup>L;

500---细胞数量, 万。

d---96 孔板光径, 0.5cm;

V1---加入样本体积, 20μL=0.02mL;

W---样品质量, g;