乙酰辅酶 A（Acetyl-CoA）含量测定试剂盒说明书

分光光度法 10 管/9 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、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

试剂一：液体 10mL×1 瓶，4℃保存。

试剂二：粉剂×1 支，-20℃保存。临用前加入 100μL 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 4μL×1 支，4℃保存。临用前加入 100μL 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 9mL 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 10mL×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×0.92 m L），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 9 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（10^4 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、 分光光度计预热 30min，用蒸馏水于 340nm 处调零。

2、取 920μL 工作液和 100μL 样本至 1mL 石英比色皿，混匀，立即记录 340nm 处 20s 的吸光值 A1 和 80s 时的吸光值 A2，计算 ΔA=A2-A1。

乙酰辅酶 A 含量计算

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×ΔA＋0.012) ×V1]÷(V1×Cpr)=(1640×ΔA＋0.012) ÷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×ΔA＋0.012) ×V1]÷(W×V1÷V2)=(1640×ΔA＋0.012) ÷W

(3) 按照细菌或细胞密度计算：

乙酰辅酶 A 含量(nmol/10^4)=[(1640×ΔA＋0.012)×V1]÷(500×V1÷V2)=(1640×ΔA＋0.012)÷500

V1：加入反应体系中样本体积，0.1mL；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。