

乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 含量测定试剂盒说明书

(货号: G0826F 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、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℃)下,5min 后于 340nm 处读取 A1 值。	

试剂四	20
混匀，室温（25℃）下，反应 10min 后于 340nm 处读取吸光值 A2， $\Delta A=A2-A1$ 。	

五、结果计算：

1、按照样本质量计算：

$$\text{乙酰辅酶A 含量(nmol/g 鲜重)} = [\Delta A \div \epsilon \div d \times V2 \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) = 1446.95 \times \Delta A \div W$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数，6220 L/mol/cm；

d---光径，1cm；

V---提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，80 μ L=0.08mL；

V2---反应体系总体积，720 μ L=7.2 $\times 10^{-4}$ L；

W---样品质量，g。