

乙酰辅酶 A 含量试剂盒说明书

(货号: ADS-W-S009-48 微板法 48 样)

有效期: 3 个月

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/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

试剂一: 液体 50ml×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 粉剂×1 支, -20℃ 保存。临用前加入 125uL 试剂五充分溶解备用。

试剂三: 液体 5 μl×1 支, 4℃ 保存。临用前加入 125uL 试剂五充分溶解备用。

试剂四: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存。临用前加入 11.25mL 试剂五充分溶解备用。

试剂五: 液体 15ml×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 96 样); 加样前置 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴锅中预热 30 min。

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 (104 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、将工作液置 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴锅中预热 10 min。

2、取 25uL 样本和 230uL 工作液至微量石英比色皿或者 96 孔板, 混匀, 立即记录 340nm 处 20s 的吸光值 A1 和 80s 时的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

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:

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)。

(1) 按照蛋白浓度计算

乙酰辅酶 A 含量 (nmol/mg prot) = (1640×ΔA + 0.012) ÷ Cpr

(2) 按照样品质量计算

乙酰辅酶 A 含量 (nmol/mg prot) = (1640×ΔA + 0.012) ÷ (W ÷ V 样总)
= (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/10⁴) = (1640×ΔA + 0.012) ÷ (500 ÷ V 样总)
= 0.002 × (1640×ΔA + 0.012)

V 样总: 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。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下:

标准条件下测定的回归方程为 $y = 3280x + 0.024$; x 为吸光值, y 为标准品浓度 (nmol/mL)。

(1) 按照蛋白浓度计算

乙酰辅酶 A 含量 (nmol/mg prot) = (3280×ΔA + 0.024) ÷ Cpr

(2) 按照样品质量计算

乙酰辅酶 A 含量 (nmol/mg prot) = (3280×ΔA + 0.024) ÷ (W ÷ V 样总)
= (3280×ΔA + 0.024) ÷ W

W: 样品质量, g; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL;

(3) 按照细菌或细胞密度计算:

乙酰辅酶 A 含量 (nmol/10⁴) = (3280×ΔA + 0.024) ÷ (400 ÷ V 样总)
= 0.002 × (3280×ΔA + 0.024)

V 样总: 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。

注意: 本试剂盒最低检测限为 1.6nmol/mL。