

乙酰辅酶 A 检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1112

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/96T

检测范围：50-3, 200nmol/mL（标准品对应的检测范围） 灵敏度：50nmol/mL（标准品对应的灵敏度）

适用样本：动植物组织、细胞

产品简介

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。本试剂盒提供了一种简单、灵敏、快速的乙酰辅酶 A 检测方法，其检测原理是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。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，NADH 在 340nm 处有特征吸收峰，通过检测 340nm 吸光值的增加既可得到乙酰辅酶 A 含量。

产品内容

| 试剂盒组分 | 规格 | | 储存条件 |
|------------|------|-------|----------|
| | 48T | 96T | |
| 提取液 | 50mL | 100mL | 4℃保存 |
| 试剂一 | 5 μL | 10 μL | -20℃避光保存 |
| 试剂二 | 5 μL | 10 μL | -20℃避光保存 |
| 试剂三 | 1 | 1 | -20℃避光保存 |
| 试剂四 | 15mL | 30mL | 4℃保存 |
| 标准品 (NADH) | 1 | 1 | -20℃避光保存 |

自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计（能测 340nm 处的吸光度）
 96 孔 UV 微孔板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头
 水浴锅、制冰机，低温离心机
 去离子水
 匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

提取液：即用型；使用前，平衡到室温；4℃保存。

试剂一：临用前配制，对于 48T，加入 125 μL 试剂四 充分溶解备用；对于 96T，加入 250 μL 试剂四 充分溶解备用，未用完的试剂-20℃分装保存。

试剂二：临用前配制，对于 48T，加入 125 μL 试剂四 充分混匀备用；对于 96T，加入 250 μL 试剂四 充分溶解备用，未用完的试剂-20℃分装保存。

产品说明书

试剂三：临用前配制，对于 48T，加入 11.3mL 试剂四充分溶解备用；对于 96T，加入 22.5mL 试剂四充分溶解备用，未用完的试剂-20℃分装保存。

工作液：临用前请根据样本数配制，计算工作液体积（样本数×0.23mL），将试剂一、试剂二和试剂三按照 1:1:90 的比例混合，或者直接把试剂一和试剂二加入到试剂三混匀（可以测定 48 样或 96 样）。

标准品（NADH）：临用前配制，加入 1mL 去离子水充分溶解备用，得 8,000nmol/mL 标准品，未用完的试剂-20℃分装保存。

标准曲线设置：按照如下表格，用去离子水将 8,000 nmol/mL 标准品稀释为 3,200、1,600、800、400、200、100、50、0 nmol/mL 的标准溶液。

| | 标准液体积 | 去离子水体积 (μL) | 浓度 (nmol/mL) |
|--------|----------------------------------|-------------|--------------|
| Std. 1 | 100 μL 8,000 nmol/mL | 150 | 3,200 |
| Std. 2 | 100 μL of Std. 1 (3,200 nmol/mL) | 100 | 1,600 |
| Std. 3 | 100 μL of Std. 2 (1,600 nmol/mL) | 100 | 800 |
| Std. 4 | 100 μL of Std. 3 (800 nmol/mL) | 100 | 400 |
| Std. 5 | 100 μL of Std. 4 (400 nmol/mL) | 100 | 200 |
| Std. 6 | 100 μL of Std. 5 (200 nmol/mL) | 100 | 100 |
| Std. 7 | 100 μL of Std. 6 (100 nmol/mL) | 100 | 50 |

样本制备

细胞样本：收集 500 万细胞到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 13,000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

组织样本：称取 0.1 g 组织，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，然后 13,000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

注意：建议使用新鲜样本。如果不立即使用，可将样品在-80℃下保存一个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 Bradford 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

- 酶标仪或紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 340nm，紫外分光光度计去离子水调零。
- 工作液于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 10min。
- 测定：在 96 孔 UV 微孔板或微量石英比色皿中，按照下表进行实验

| | 测定孔 (μL) | 标准孔 (μL) | 空白孔 (μL) |
|----------|----------|----------|----------|
| 样本 | 25 | 0 | 0 |
| 不同浓度的标准品 | 0 | 25 | 0 |
| 去离子水 | 0 | 230 | 255 |
| 工作液 | 230 | 0 | 0 |

混匀，立刻测定 340nm 处吸光度 A_1 ，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 10min，测定 340nm 处吸光度 A_2 ，计算 $\Delta A_{测} = A_{2测} - A_{1测}$ ， $\Delta A_{标} = A_{2标} - A_{2空}$ （空白和标准曲线只需做 1 次）。

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 $\Delta A_{测}$ 小于 0.001 可适当加大样本量。如果 $\Delta A_{测}$ 大于 1，样本可用提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以 $\Delta A_{\text{标}}$ 为x轴，标准品浓度为y轴，制作标准曲线（浓度为y轴更方便计算结果），得到方程，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 带入方程，得到y值。

2. 乙酰辅酶A含量计算

(1) 按样本蛋白浓度计算：

乙酰辅酶A含量 (nmol/mg prot) = $(y \times V_{\text{样}}) \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \times n = y \div C_{\text{pr}} \times n$

(2) 按样本鲜重计算：

乙酰辅酶A含量 (nmol/g 鲜重) = $(y \times V_{\text{样}}) \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \times n = y \div W \times n$

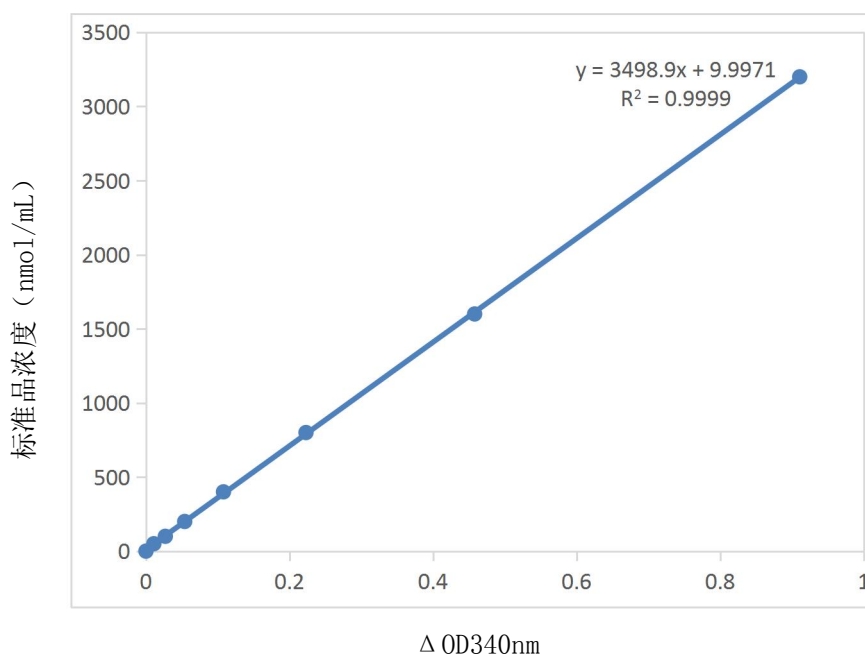
(3) 按细胞密度计算：

乙酰辅酶A含量 (nmol/ 10^4 cells) = $(y \times V_{\text{样}}) \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \times n = y \div 500 \times n = 0.002 \times y \times n$

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.025mL; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样品质量, g; $V_{\text{提取}}$: 加入提取液体积, 1 mL; 500: 细胞或细菌总数, 500万; n : 样本稀释倍数。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考，实验者需根据自己的实验建立标准曲线。



注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

- PMK1115 乳酸 (LA) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1116 丙酮酸 (PA) 检测试剂盒 (微量法)
- PMK1110 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

