

乙酰辅酶 A 含量检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0980

规格：25T/24S、50T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶配内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	25T 规格	50T 规格	保存条件
提取液一	液体 30 mL×1 瓶	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 300 μL×1 支	液体 600 μL×1 支	-20℃保存
试剂一	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂二	液体 10 μL×1 支	液体 10 μL×2 支	2-8℃保存
试剂三 A	液体 25 mL×1 瓶	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三 B	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂四	液体 5 mL×1 瓶	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存

25T 溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前加入 325μL 试剂四，充分溶解；用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融；
- 2、试剂二：临用前取 1 支先将液体甩离至管底，然后加入 250μL 试剂四，充分溶解；用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融；
- 3、试剂三：临用取试剂三 B 加入 24mL 试剂三 A，充分溶解；用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融；
- 4、工作液：临用前将试剂一、二和三按照 1:1:90 的比例混合，根据样本量现配现用。

50T 溶液的配制：

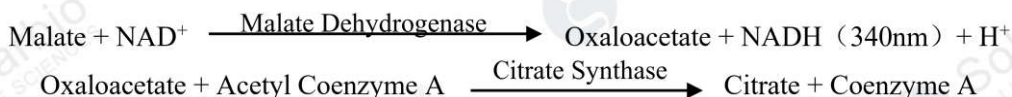
- 1、试剂一：临用前取加入 325 μL 试剂四，充分溶解；用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融；
- 2、试剂二：临用前取 1 支先将液体甩离至管底，然后加入 250 μL 试剂四，充分溶解；用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融；
- 3、试剂三：临用前取 1 瓶试剂三 B 加入 24 mL 试剂三 A，充分溶解；用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融；
- 4、工作液：临用前将试剂一、二和三按照 1:1:90 的比例混合，根据样本量现配现用。

产品说明：

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。

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。





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。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、天平、水浴锅/恒温培养箱、台式低温离心机、1mL 石英比色皿、可调式移液枪、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理

1. 组织：建议称取约 0.1g 样本，加入 0.99mL 提取液一和 0.01mL 提取液二进行冰浴匀浆。于 4℃，8000g 离心 10min，取上清，置于冰上待测。
2. 细胞或细菌：建议取 500 万细胞或细菌加入 0.99mL 提取液一和 0.01mL 提取液二，冰浴超声波破碎细胞或细菌（功率 200w，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次），于 4℃，8000g 离心 10min，取上清，置于冰上待测。
3. 血清（浆）或其他液体：直接检测，若液体有浑浊则离心后测定。

二、测定步骤

1. 紫外分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
2. 将工作液 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）预热 10min。
3. 取 200μL 样本和 820μL 工作液至 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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

三、乙酰辅酶 A 含量计算

1. 按样本质量计算

$$\text{乙酰辅酶 A 含量 (nmol/g 质量)} = (\Delta A \div \epsilon \div d) \times V_{\text{反}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \times V_{\text{提}} \div W \times F = 819.9 \times \Delta A \div W \times F$$

2. 按照细胞数量计算

$$\text{乙酰辅酶 A 含量 (nmol/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A \div \epsilon \div d) \times V_{\text{反}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \times V_{\text{提}} \div 500 \times F = 1.640 \times \Delta A \times F$$

3. 按液体体积计算

$$\text{乙酰辅酶 A 含量 (nmol/mL)} = (\Delta A \div \epsilon \div d) \times V_{\text{反}} \times 10^9 \div V_{\text{样}} \times F = 819.9 \times \Delta A \times F$$

ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d: 1mL 石英比色皿光径, 1cm; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$;

V 反: 反应总体积, $1.02 \times 10^{-3} \text{ L}$; V 样: 加入样本上清体积, 0.2mL; V 提: 加入提取液一和提取液二的总体积, 1mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌数量, 500 万; F: 稀释倍数。

实验实例：

1. 称取 0.1g 鼠肾加入 0.99mL 提取液一和 0.01mL 提取液二进行匀浆研磨，离心后取上清，按照测定步骤操作，用 1mL 石英比色皿测得计算 $\Delta A = A2 - A1 = 0.745 - 0.667 = 0.078$ ，按样本质量计算酶活得：
乙酰辅酶 A 含量 (nmol/g 质量) = $819.9 \times 0.078 \div 0.1 = 639.5 \text{ nmol/g 质量}$ 。

相关发表文献：

- [1] Li W, Huang X, Liu H, Lian H, Xu B, Zhang W, Sun X, Wang W, Jia S, Zhong C. Improvement in bacterial cellulose production by co-culturing *Bacillus cereus* and *Komagataeibacter xylinus*. *Carbohydr Polym.* 2023 Aug 1;313:120892. doi: 10.1016/j.carbpol.2023.120892. Epub 2023 Apr 11. PMID: 37182977.



- [2] Zhang N, Song L, Xu Y, Pei X, Luisi BF, Liang W. The decarboxylase FoSir5 facilitates mitochondrial metabolic state switching in conidial germination of *Fusarium oxysporum*. *Elife*. 2021 Dec 20;10:e75583. doi: 10.7554/eLife.75583. PMID: 34927582; PMCID: PMC8730727.
- [3] Hu L, Guo C, Chen J, Jia R, Sun Y, Cao S, Xiang P, Wang Y. Venturicidin A Is a Potential Fungicide for Controlling *Fusarium* Head Blight by Affecting Deoxynivalenol Biosynthesis, Toxisome Formation, and Mitochondrial Structure. *J Agric Food Chem*. 2023 Aug 23;71(33):12440-12451. doi: 10.1021/acs.jafc.3c02683. Epub 2023 Aug 10. PMID: 37566096.
- [4] Cao W, Zhang L, Wu L, Zhang M, Liu J, Xie Z, Liu H. Identification and genetic characterization of mitochondrial citrate transporters in *Aspergillus niger*. *Front Microbiol*. 2022 Sep 13;13:1009491. doi: 10.3389/fmicb.2022.1009491. PMID: 36177470; PMCID: PMC9512666.
- [5] Liu J, Zhang S, Li W, Wang G, Xie Z, Cao W, Gao W, Liu H. Engineering a Phosphoketolase Pathway to Supplement Cytosolic Acetyl-CoA in *Aspergillus niger* Enables a Significant Increase in Citric Acid Production. *J Fungi (Basel)*. 2023 Apr 23;9(5):504. doi: 10.3390/jof9050504. PMID: 37233215; PMCID: PMC10219267.

相关系列产品:

- BC0710/BC0715 α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性检测试剂盒
- BC2150/BC2155 柠檬酸 (CA) 含量检测试剂盒
- BC0950/BC0955 琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性检测试剂盒
- BC0380/BC0385 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒
- BC2160/BC2165 线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 活性检测试剂盒

