

乙酰辅酶 A 含量检测试剂盒说明书

微量法

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：BC0985

规格：100T/96S

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

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
提取液二	液体 0.6 mL×2 支	-20℃保存
试剂一	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂二	液体 5 μL×2 支	2-8℃保存
试剂三 A	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三 B	粉剂×2 瓶	-20℃保存
试剂四	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃保存

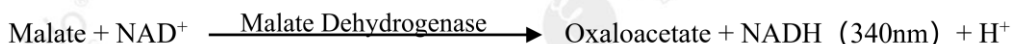
溶液的配制：

- 1、试剂一：临用前加入 163μL 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 125μL 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 12mL 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/酶标仪、天平、水浴锅/恒温培养箱、台式低温离心机、微量石英比色皿/96孔UV板、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（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

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/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，分光光度计蒸馏水调零。
2. 将工作液 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）预热 10min。
3. 取 50μL 样本和 205μL 工作液至微量石英比色皿或 96 孔 UV 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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

三、乙酰辅酶 A 含量计算

A、使用微量石英比色皿测定

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 : 微量石英比色皿光径, 1cm; 10^9 : 单位换算系数, $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$;

$V_{\text{反}}$: 反应总体积, $2.55 \times 10^{-4} \text{ L}$; $V_{\text{样}}$: 加入样本上清体积, 0.05mL; $V_{\text{提}}$: 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。

B、使用 96 孔 UV 板测定

将上述公式中的 $d=1\text{cm}$ 改为 $d=0.6\text{cm}$ （96 孔 UV 板光径）进行计算即可。

实验实例:

1. 称取 0.1g 兔肾加入 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，稀释 2 倍后按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A = A2 - A1 = 0.8083 - 0.7691 = 0.0392$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{乙酰辅酶 A 含量 (nmol/g 质量)} = 819.9 \times 0.0392 \div 0.1 \times 2 = 642.8 \text{ nmol/g 质量}。$$

相关发表文献:

- [1] Sun J, Lin Z, Liao Z, Wu Z, Li H, Wang H. Small extracellular vesicles derived from human adipose-derived stem cells regulate energetic metabolism through the activation of YAP/TAZ pathway facilitating angiogenesis. Cell Biol Int. 2023 Feb;47(2):451-466. doi: 10.1002/cbin.11938. Epub 2022 Oct 23. PMID: 36279478.
- [2] Zeng M, Shao C, Zhou H, He Y, Li W, Zeng J, Zhao X, Yang J, Wan H. Protocatechudehyde improves mitochondrial energy metabolism through the HIF1 伪/PDK1 signaling pathway to mitigate ischemic stroke-elicited internal capsule injury. J Ethnopharmacol. 2021 Sep 15;277:114232. doi: 10.1016/j.jep.2021.114232. Epub 2021 May 24. PMID: 34044078.



- [3] Xie D, Sun Y, Lei Y. Effect of glucose levels on carbon flow rate, antioxidant status, and enzyme activity of yeast during fermentation. *J Sci Food Agric*. 2022 Sep;102(12):5333-5347. doi: 10.1002/jsfa.11887. Epub 2022 Apr 27. PMID: 35318660.
- [4] Liang Y, Zhao L, Dai C, Liu G, Zhong Y, Liu H, Mo L, Tan C, Liu X, Chen L. Epileptiform Discharges Reduce Neuronal ATP Production by Inhibiting F0F1-ATP Synthase Activity via A Zinc-Dependent 2-Glycoprotein-Dependent Mechanism. *Mol Neurobiol*. 2023 Nov;60(11):6627-6641. doi: 10.1007/s12035-023-03508-3. Epub 2023 Jul 20. PMID: 37468739.

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

