

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K907-M

产品规格: 48T (32 samples)/96T (80 samples)

检测仪器: 酶标仪(440-460 nm)

Elabscience®辅酶 A(CoA)比色法测试盒

Coenzyme A (CoA) Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、动物组织和细胞样本中辅酶 A 的含量。

检测原理

辅酶 A(CoA)由半胱氨酸、泛酸和 ATP 衍生的单位组成。它在脂肪酸的合成和氧化、柠檬酸循环中的丙酮酸氧化以及其他生物过程中起着重要作用。

CoA 通过酶促反应生成 NADH, 与显色剂反应产生的显色物质在 450 nm 处有特征吸收峰, 通过检测吸光度大小可以确定样本中的 CoA 的含量。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extracting Solution)	50 mL × 1 瓶	50 mL × 2 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	10 mL × 1 瓶	20 mL × 1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 (Substrate)	2.5 mL × 1 瓶	5 mL × 1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	促进剂 (Accelerant)	0.8 mL × 1 支	1.6 mL × 1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	酶溶液 (Enzyme Solution)	0.5 mL × 1 支	1.0 mL × 1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	显色剂 (Chromogenic Agent)	1.5 mL × 1 支	1.5 mL × 2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	标准品 (Standard)	粉剂 × 1 支	粉剂 × 2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	1 板		
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明: 试剂严格按上表中的保存条件保存, 不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂, 使用前请先离心, 以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器: 酶标仪(波长 440-460 nm, 最佳检测波长为 450 nm)、涡旋混匀仪, 37 °C 恒温培养箱

试剂: 1 mol/L 高氯酸, 3 mol/L KHCO_3

试剂准备

① 检测前, 试剂盒中的试剂平衡至25°C。

② 反应工作液的配制:

按照试剂二: 试剂三: 试剂四 = 9: 3: 1 的体积比配制反应工作液, 置于冰上待用, 未使用完的试剂-20 °C 避光可保存 3 天。

③ 试剂五工作液的配制:

按试剂五: 试剂二 = 1: 4 的体积比配制试剂五工作液, 现配现用, 按需配制, 置于冰上待用, 当天使用有效。

④ 1 mmol/L 标准品的配制:

取一支试剂七加入 1 mL 试剂二溶解, 置于冰上待用, 未用完的部分可分装-20 °C 下避光保存 7 天, 避免反复冻融。

⑤ 不同浓度标准品的稀释:

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	0	0.05	0.2	0.25	0.3	0.4	0.45	0.5
1 mmol/L 标准品(μL)	0	10	40	50	60	80	90	100
试剂二(μL)	200	190	160	150	140	120	110	100

样本准备

① 样本处理

血清血浆：取 50 μL 的血清或血浆样本加 100 μL 的 1 mol/L 的高氯酸混匀至少 1 min，加 3 mol/L KHCO_3 调 pH 至 7-8，4 $^\circ\text{C}$ ，10000 $\times\text{g}$ ，离心 10 min 取上清备用（上述用酸碱处理样本的过程中会有一些的稀释倍数，具体稀释倍数需要根据 KHCO_3 加入的具体量计算）。

组织样本：按照组织样本质量(g)：试剂一体积(mL) = 1：9 的比例匀浆，4 $^\circ\text{C}$ ，10000 $\times\text{g}$ 离心 10 min 后取上清，按照上清液：1 mol/L 高氯酸 = 4：1 的比例加入高氯酸涡旋混匀至少 1 min，加 3 mol/L KHCO_3 调 pH 至 7-8(加入 KHCO_3 调 pH 产气剧烈，请小心缓慢滴加)，4 $^\circ\text{C}$ ，10000 $\times\text{g}$ ，离心 10 min 后取上清放置在冰盒上备用(上述用酸碱处理样本的过程中会有一些的稀释倍数，具体稀释倍数需要根据 KHCO_3 加入的具体量计算)。

细胞样本：收集 1×10^6 个细胞，加入 200 μL 的试剂一匀浆(4 $^\circ\text{C}$)处理，4 $^\circ\text{C}$ ，10000 $\times\text{g}$ ，离心 10 min 后取上清，按照上清液：1 mol/L 高氯酸 = 2：1 的比例加入高氯酸混匀至少 1 min，加 3 mol/L KHCO_3 调 pH 至 7-8(加入 KHCO_3 调 pH 产气剧烈，请小心缓慢滴加)，4 $^\circ\text{C}$ ，10000 $\times\text{g}$ ，离心 10 min 后取上清放置在冰盒上备用(上述用酸碱处理样本的过程中会有一些的稀释倍数，具体稀释倍数需要根据 KHCO_3 加入的具体量计算)。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.005 - 0.5 mmol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠肺组织匀浆	不稀释	1×10 ⁶ 个 293T 细胞匀浆	不稀释
10%小鼠肝组织匀浆	不稀释	1×10 ⁶ 个 Molt-4 细胞匀浆	不稀释
10%小鼠心脏组织匀浆	不稀释	1×10 ⁶ 个 HL-60 细胞匀浆	不稀释
10%小鼠脑组织匀浆	不稀释	小鼠血清(浆)	不稀释
人血清(浆)	不稀释		

样本稀释液为试剂一。

实验关键点

待测样本需要放置在冰盒上操作，样本处理后在 4 h 内使用。

操作步骤

- ① 标准孔：取 20 μL 不同浓度标准品溶液加入相应的酶标孔中。
测定孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
- ② 向步骤①中各孔中加入 130 μL 的反应工作液；
- ③ 向步骤②各孔中加入 40 μL 的试剂五工作液。
- ④ 向步骤③各孔中加入 20 μL 的试剂六。
- ⑤ 振板 3 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min，酶标仪于 450 nm 处测定各孔 OD 值。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
反应工作液(μL)	130	130
试剂五工作液(μL)	40	40
试剂六(μL)	20	20
振板 3 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min，酶标仪于 450 nm 处测定各孔 OD 值。		

结果计算

标准曲线: $y = ax + b$

血清或血浆样本中辅酶 A(CoA)含量计算公式:

$$\text{CoA 含量 (mmol/L)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \times f$$

组织样本中辅酶 A(CoA)含量计算公式:

$$\text{CoA 含量 (mmol/kg wet weight)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div m \times V \times f$$

细胞样本中辅酶 A(CoA)含量计算公式:

$$\text{CoA 含量 (mmol/10^6)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div n \times V \times f$$

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值 (标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x: 标准品的浓度

a: 标准曲线的斜率

b: 标准曲线的截距

ΔA_{450} : 测定孔 OD 值-空白 OD 值 (标准品浓度为 0 时的 OD 值)

m: 样本质量, kg

V: 加入的提取液的体积, L

n: 细胞样本的数量, 10^6

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

附录1 关键数据

1. 技术参数

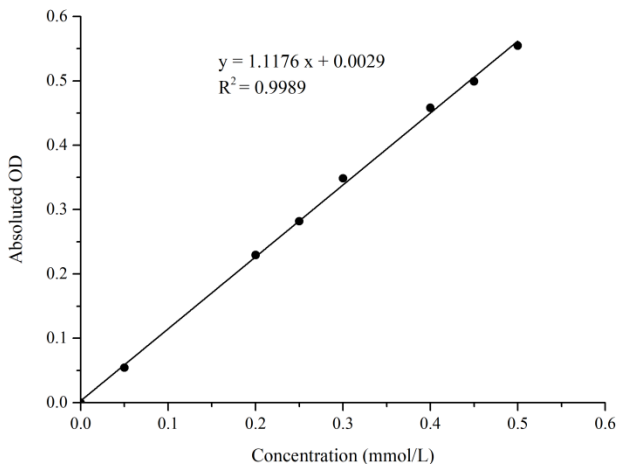
检测范围	0.005-0.5 mmol/L	批间差	0.6-7.5 %
灵敏度	0.005 mmol/L	批内差	0.8-2.2 %
加标回收率	90-110%		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量为20 μL，按照操作表进行操作记录OD值，结果如下：

标准品浓度 (mmol/L)	0	0.05	0.2	0.25	0.3	0.4	0.45	0.5
OD 值	0.080	0.134	0.313	0.363	0.428	0.540	0.576	0.634
	0.080	0.134	0.306	0.361	0.429	0.536	0.582	0.635
平均 OD 值	0.080	0.135	0.310	0.362	0.429	0.538	0.579	0.635
绝对 OD 值	0.000	0.055	0.230	0.282	0.349	0.458	0.499	0.555

②绘制标准曲线，如下图所示：



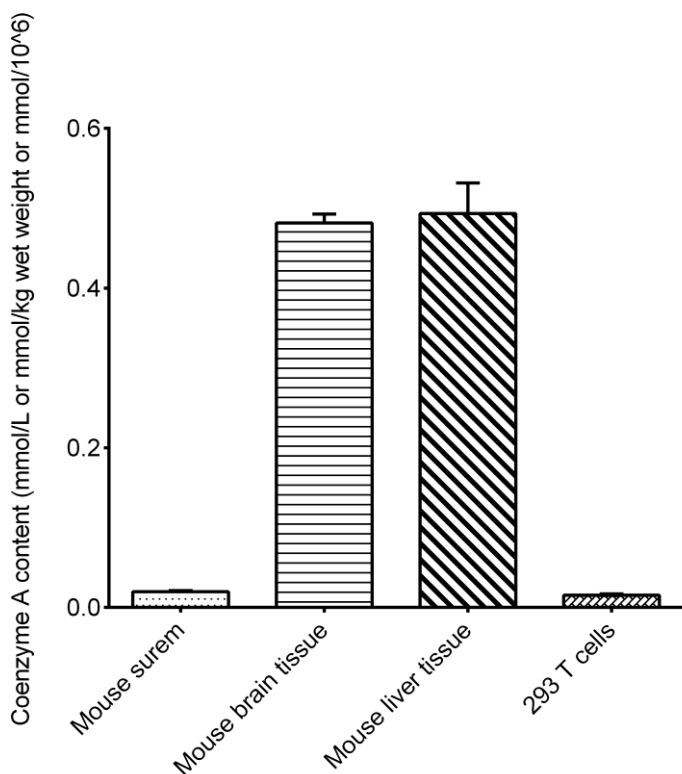
附录2 实例分析

例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考):

取20 μL 10%小鼠肝组织匀浆上清液加入到酶标板孔中,按操作表操作,结果如下:标准曲线: $y = 1.1176x + 0.0029$, 测定孔的平均OD值为0.144, 空白孔的平均OD值为0.080, $\Delta A_{450} = 0.144 - 0.080 = 0.064$, 计算结果为:

CoA 含量
(mmol/kg wet weight) = $(0.064 - 0.0029) \div 1.1176 \div 0.0001 \times 0.0009 = 0.492$ mmol/kg wet weight

按照说明书操作,测定小鼠血清(加样量 20 μL)、小鼠脑组织(10%小鼠脑组织匀浆,加样量 20 μL)、小鼠肝组织(10%小鼠肝组织匀浆,加样量 20 μL)和 293T 细胞(1×10^6 个,加样量 20 μL)中 CoA 含量(如下图):



声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

