（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!）

产品货号：GBQ192

产品规格：48T(44 samples)/96T(92 samples)

检测仪器：酶标仪(330-350 nm)

Elabscience®乙酰辅酶 A 比色法测试盒

Acetyl-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动物组织样本中的乙酰辅酶 A(Acetyl-CoA)的含量。

检测原理

苹果酸与 NAD^+在苹果酸脱氢酶的作用下生成草酰乙酸和 NADH，乙酰辅酶 A 和草酰乙酸在柠檬酸合成酶的作用下生成辅酶 A 与柠檬酸。在苹果酸脱氢酶与柠檬酸合成酶的偶合作用下，通过 340 nm 处吸光度的变化，测定乙酰辅酶 A 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)	60 mL×1 瓶	60 mL×2 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	20 mL×1 瓶	40 mL×1 瓶	-20°C 保存 3 个月
试剂三 (Reagent 3)	酶试剂 A (Enzyme Reagent A)	酶液×1 支	酶液×2 支	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂四 (Reagent 4)	酶试剂 B (Enzyme Reagent B)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂五 (Reagent 5)	底物 (Substrate)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20°C 避光 保存 3 个月
试剂六 (Reagent 6)	500 nmol/mL 标准品 (500 nmol/mL Standard)	0.16 mL×1 支	0.32 mL×1 支	-20°C 避光 保存 3 个月
	96 孔紫外酶标板	96 孔×1 块		无要求
	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(330-350 nm，最佳检测波长 340 nm)

试剂准备

① 检测前，所有试剂平衡至室温。

② 试剂三工作液的配制：

取一支试剂三加入500 μL试剂二混匀，配好的试剂三工作液分装后-20ºC避光保存3天，禁止反复冻融。

③ 试剂四工作液的配制：

取一支试剂四加入500 μL双蒸水溶解，配好的试剂四工作液2-8ºC条件下可避光保存3天。

④ 试剂五工作液的配制：

取一支试剂五加入500 μL试剂二溶解，配好的试剂五工作液2-8ºC条件下可避光保存3天。

⑤ 反应工作液的配制：

按照试剂二：试剂三工作液：试剂四工作液：试剂五工作液=200: 7: 5: 6的体积比混匀，现配现用，按需配制，配好的反应工作液在室温避光静置10 min后使用。

样本准备

① 样本处理

组织样本：按照组织重量(g)：试剂一(mL)的比例=1: 9进行匀浆，4ºC，10000 × g离心10 min(样本上清若浑浊可多次离心)，取上清液置于冰上待测。

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，根据预实验结果，结合本试剂盒最佳检测范围150-500 nmol/mL，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠肺组织	不稀释	10%大鼠肝组织	不稀释
10 %大鼠脾组织	不稀释	10%大鼠肾组织	不稀释
10%小鼠肺组织	不稀释	10%小鼠肾组织	不稀释

注：稀释液为试剂一。

实验关键点

① 检测过程反应速率快，需要在加入反应工作液后立即开始测定 A_1，否则测定结果偏小。

② 反应工作液在室温避光静置 10 min 后使用。

③ 检测样本时建议一次不超过 5 个样本。

操作步骤

① 标准孔：取 30 μL 标准品加入标准孔中。

空白孔：取 30 μL 试剂一加入空白孔中。

测定孔：取 30 μL 待测样本加入相应的测定孔中

② 向步骤①中各孔加入 230 μL 反应工作液

③ 振板 3 s 混匀，酶标仪波长 340 nm 下立即测定 OD 值 A_1 和 1 min 后的 OD 值 A_2，计算$\Delta A=A_2-A_1$。

操作表

	标准孔	空白孔	测定孔
500 nmol/mL 标准品(μL)	30	--	--
试剂一(μL)	--	30	--
待测样本(μL)	--	--	30
反应工作液(μL)	230	230	230
振板 3 s 混匀，酶标仪波长 340 nm 下立即测定 OD 值 A_1 和 1 min 后的 OD 值 A_2，计算$\Delta A=A_2-A_1$。			

结果计算

组织中乙酰辅酶 A 含量：

$$\text{乙酰辅酶 A (nmol/g wet weight)} = \frac{\Delta A_{测} - \Delta A_{空}}{\Delta A_{标} - \Delta A_{空}} \times 500^* \times V \div m \times f$$

注解：

$\Delta A_{测}$：测定孔变化 OD 值

$\Delta A_{标}$：标准孔变化 OD 值

$\Delta A_{空}$：空白孔变化 OD 值

500*：标准品的浓度，500 nmol/mL

V：样本匀浆液体积，mL

m：组织湿重，g

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	150-500 nmol/mL	**平均批间差**	5.3 %
灵敏度	150 nmol/mL	**平均批内差**	4 %
平均回收率	103 %		

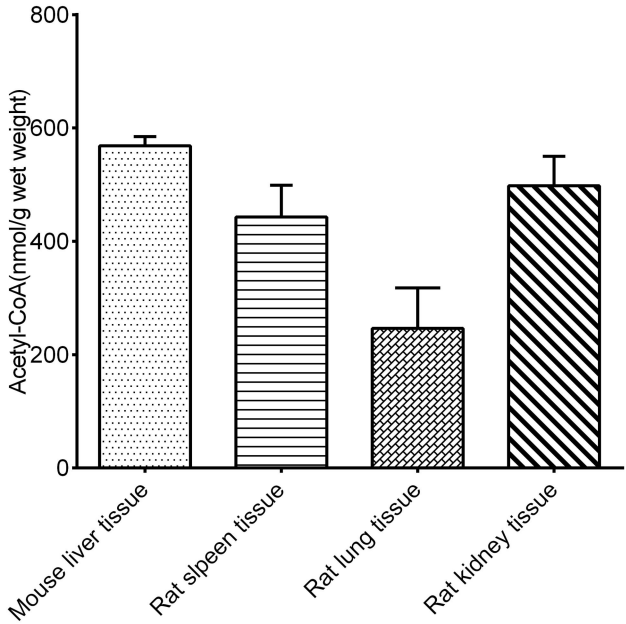
附录2 实例分析

例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考)：

取10%小鼠肝组织匀浆上清液样本30 μL，按操作表操作，结果如下：测定孔A_1值为0.271，A_2值为0.282，$\triangle A_{测} = 0.282 - 0.271 = 0.011$，空白孔$A_1$值为0.07，$A_2$值为0.07，$\triangle A_{空} = 0.07 - 0.07 = 0$，标准孔$A_1$值为0.194，$A_2$值为0.283，$\triangle A_{标} = 0.283 - 0.194 = 0.089$，计算结果为：

$$\begin{aligned}\text{乙酰辅酶 A (nmol/g wet weight)} &= \frac{(0.011 - 0) \times 500}{0.089 - 0} \times 0.9 \div 0.1 \\ &= 556.18 \text{ nmol/g wet weight}\end{aligned}$$

按说明书操作，测定10%小鼠肝组织(加样量30 μL)、10%大鼠脾组织(加样量30 μL)、10%大鼠肺组织 (加样量30 μL)和10%大鼠肾组织(加样量为30 μL)中的乙酰辅酶A含量(如下图)：



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
样本测量 OD 值很低	一次测定样本数较多	使用排枪加入反应工作液或减少单次测定样本数（少于 5 个样本）

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。