

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ031

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 587 nm)

Elabscience®乙酰辅酶 A(Acetyl-CoA)荧光法测试盒
Acetyl Coenzyme A (Acetyl-CoA) Fluorometric
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乙酰辅酶 A (Acetyl-CoA) 的含量。

检测原理

乙酰辅酶 A(Acetyl-CoA) 是酶促乙酰转移反应中必需的辅助因子和酰基载体。它可以通过线粒体中丙酮酸的氧化脱羧、长链脂肪酸的氧化或某些氨基酸的氧化降解而形成。Acetyl-CoA 是柠檬酸循环的起始化合物。

本试剂盒的检测原理为 Acetyl-CoA 在酶催化的条件下转化生成其他物质，产生的荧光在最大激发波长 535 nm，最大发射波长 587 nm 下使用荧光酶标仪检测。

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)	40 mL × 1 瓶	40 mL × 2 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution)	24 mL × 1 瓶	48 mL × 1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	辅因子 (Co-factor)	粉剂 × 2 瓶	粉剂 × 4 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 (Substrate)	粉剂 × 2 瓶	粉剂 × 4 瓶	-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)	酶试剂 (Enzyme Reagent)	0.36 mL × 1 支	0.72 mL × 1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂七 (Reagent 7)	荧光探针 (Fluorescence Probe)	3 mL × 1 瓶	6 mL × 1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂八 (Reagent 8)	500 μmol/L 标准品 (500 μmol/L Standard)	0.5 mL × 1 支	0.5 mL × 1 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔黑色酶标板	1 板		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：荧光酶标仪(激发波长 535 nm，发射波长 587 nm)、涡旋混匀仪
耗材：10KD 超滤管

试剂准备

- ① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至25℃；
- ② 试剂三工作液的配制：
取一瓶试剂三加入8 mL的试剂二溶解后，-20℃下保存3天。
- ③ 试剂四工作液的配制：
取一瓶试剂四加入7.5 mL的试剂三工作液溶解后使用，-20℃下保存，3天内使用有效 (试剂三和试剂四为粉剂，开盖需注意以免试剂洒落)。
- ④ 酶工作液的配制：
按照试剂五：试剂六：试剂二体积比为4：3：28的体积比配制酶工作液，按需配制，当天使用有效。
- ⑤ 5 μmol/L 标准品的配制：
按照试剂八：双蒸水体积比 = 1：99 的体积比进行配制，如吸取 10 μL 的试剂八用990 μL 的双蒸水稀释得到 5 μmol/L 的标准品溶液,置于冰上待用，剩余的试剂八可分装，尽量避免反复冻融。5 μmol/L 标准品稀释后稳定性下降，4 h 内使用有效。
- ⑥ 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(μmol/L)	0	1	2	3	3.5	4	4.5	5
5 μmol/L 标准品(μL)	0	40	80	120	140	160	180	200
双蒸水(μL)	200	160	120	80	60	40	20	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆): 取 200-400 μL 血清血浆样本加入 10 KD 超滤管中, 离心(4°C , $12000 \times g$, 20 min), 取超滤后外管中的滤出液于冰盒上待测。

组织样本: 称取 0.1 g 的组织样本加入 900 μL 试剂一匀浆, 离心(4°C , $10000 \times g$, 10 min), 取 200-400 μL 上清加入到 10 KD 超滤管中, 离心(4°C , $12000 \times g$, 20 min), 取超滤后外管中的滤出液置于冰盒上待测。

细胞样本: 取 1×10^6 个细胞离心后弃上清, 每次加入 200 μL 试剂一, 离心(4°C , $400 \times g$, 5 min)清洗三次。清洗完成后再加入 200 μL 试剂一匀浆处理, $10000 \times g$ 离心 5 min 后取上清, 上清加入到 10 KD 超滤管中, 离心(4°C , $12000 \times g$, 20 min), 取超滤后外管中的滤出液于冰盒上待测。

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, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: $0.27\text{-}5.00 \mu\text{mol/L}$, 请参考下表稀释(仅供参考):

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%小鼠心脏组织匀浆	不稀释	1×10^6 个 CHO 细胞	不稀释
10%小鼠肝组织匀浆	不稀释	1×10^6 个 Molt-4 细胞	不稀释
10%小鼠肺组织匀浆	不稀释	1×10^6 个 HL-60 细胞	不稀释
10%小鼠肾组织匀浆	不稀释	大鼠血清	不稀释
小鼠血浆	不稀释	大鼠血浆	不稀释

注: 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, 样本处理后放置时间不宜过长, 宜在 4 个小时内检测。

操作步骤

- ① 标准孔：向酶标板的标准孔中加入 20 μL 的标准品；
测定孔：向酶标板的各测定孔中加入 20 μL 的待测样本。
- ② 向步骤①中各孔中加入 120 μL 的试剂四工作液。
- ③ 向步骤②各孔中加入 70 μL 的酶工作液。
- ④ 向步骤③各孔中加入 50 μL 的试剂七。
- ⑤ 振板 3 s，37℃ 孵育 10 min，荧光酶标仪于激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 处测定各孔荧光值， $\Delta F = F_{\text{测定}} - F_{\text{空白}}$ 。

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
试剂四工作液（μL）	120	120
酶工作液（μL）	70	70
试剂七（μL）	50	50
振板 3 s，37℃ 孵育 10 min，荧光酶标仪于激发波长 535 nm，发射波长 587 nm 处测定各孔荧光值， $\Delta F = F_{\text{测定}} - F_{\text{空白}}$ 。		

结果计算

标准曲线: $y = ax + b$

血清或血浆样本中乙酰辅酶 A(Acetyl-CoA)含量计算公式:

$$\text{Acetyl-CoA 含量 } (\mu\text{mol/L}) = (\Delta F - b) \div a \times f$$

组织样本中乙酰辅酶 A(Acetyl-CoA)含量计算公式:

$$\text{Acetyl-CoA 含量 } (\mu\text{mol/kg}) = (\Delta F - b) \div a \div m \times v \times f$$

细胞样本中乙酰辅酶 A(Acetyl-CoA)含量计算公式:

$$\text{Acetyl-CoA 含量 } (\text{nmol}/10^6) = (\Delta F - b) \div a \div n \times v \times f$$

注解:

y: 标准品荧光值-空白荧光值(标准品浓度为 0 时的荧光值)

x: 标准品的浓度

a: 标准曲线的斜率

b: 标准曲线的截距

ΔF : $\Delta F = F_{\text{测定}} - F_{\text{空白}}$, 样本的绝对荧光值(测定孔荧光值-空白孔荧光值)

m: 样本质量, kg

v: 样本匀浆时加入的试剂一体积, L

n: 细胞样本的个数, 10^6 个

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

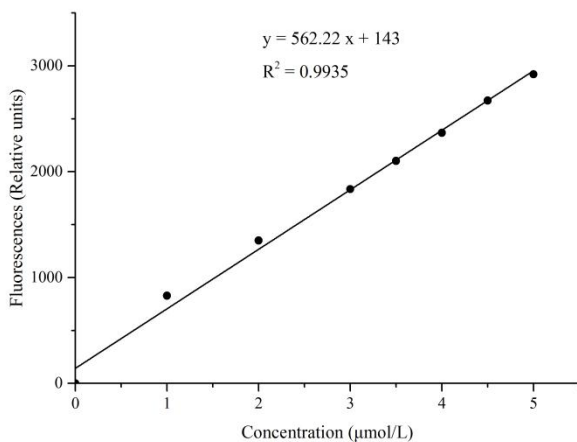
检测范围	0.27-5.00 $\mu\text{mol/L}$	批间差	2.7-3.6%
灵敏度	0.27 $\mu\text{mol/L}$	批内差	1.7-4.1%
加标回收率	92-107%		

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荧光值，结果如下：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	1	2	3	3.5	4	4.5	5
荧光值	978	1810	2337	2789	3112	3360	3655	3935
	959	1783	2301	2816	3028	3310	3625	3842
平均荧光值	968	1797	2319	2803	3070	3335	3640	3888
绝对荧光值	0	829	1351	1835	2102	2367	2672	2920

②绘制标准曲线，如下图所示：



附录2 实例分析

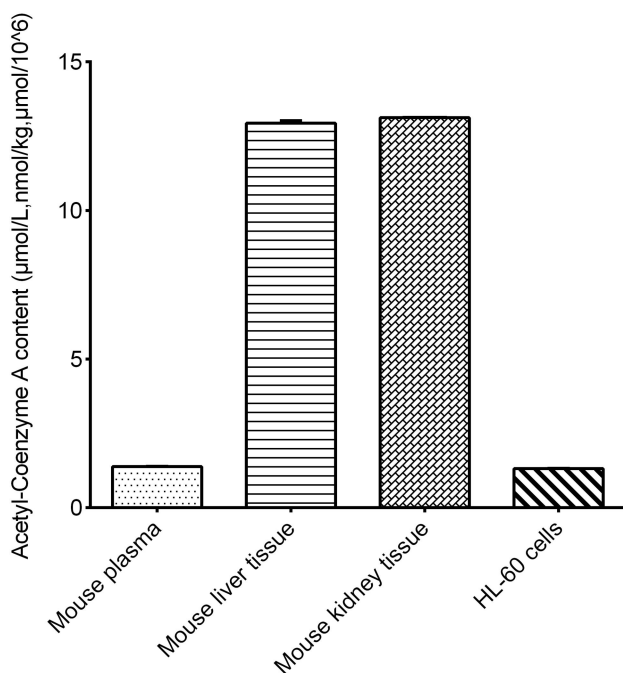
例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考):

取20 μL 10%小鼠肝组织匀浆后超滤液加入到酶标板孔中,按操作表操作,结果如下:

标准曲线为 $y = 562.22x + 143$, 测定孔荧光值 $F_{\text{测定}}$ 为1919.06, 空白孔荧光值 $F_{\text{空白}}$ 为968.10, $\Delta F = 1919.06 - 968.10 = 950.96$, 计算结果为:

$$\begin{aligned}\text{Acetyl-CoA 含量}(\mu\text{mol/kg}) &= (950.96 - 143) \div 562.22 \div 0.1 \times 0.9 \\ &= 12.93 \mu\text{mol/kg}\end{aligned}$$

按照上述操作过程,测定小鼠血浆(加样量20 μL)、10%小鼠肝组织(加样量20 μL)、10%小鼠肾组织(加样量20 μL)和HL-60细胞(1×10^6 个,加样量20 μL)中Acetyl-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。

