

## 苹果酸含量检测试剂盒(WTS显色法)(微量法)

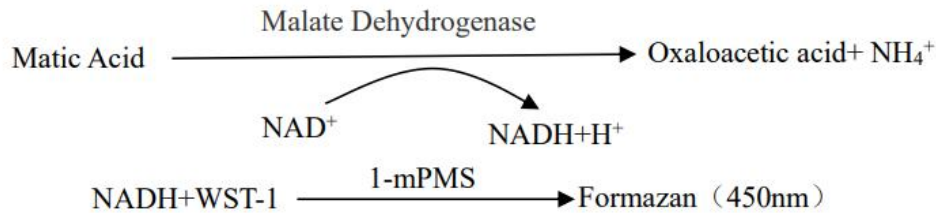
产品货号: BA2014

产品规格: 100管/48样

### 产品说明:

L-苹果酸是三羧酸循环的中间产物,也是苹果酸-天冬氨酸穿梭的重要组成部分。苹果酸-天冬氨酸穿梭是氧化磷酸化的还原当量跨线粒体膜运输过程所必需的。在低等生物体内,苹果酸在苹果乳酸发酵的过程中转化为乳酸,同时产生CO<sub>2</sub>。苹果酸常用作食品和制药工业的添加剂,苹果酸的定量分析在啤酒、葡萄酒、奶酪和水果生产领域也具有至关重要的作用。

苹果酸脱氢酶催化苹果酸和NAD生成草酰乙酸、NADH和NH<sub>4</sub><sup>+</sup>,在1-mPMS作用下,WST-1可与NADH反应,产生水溶性Formazan,在450nm下有最大吸收峰,据此可计算苹果酸含量。



**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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

### 产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体60mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体10mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体8mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂三	液体8mL×1瓶	2-8℃
试剂四	液体20 μL×1支	2-8℃
试剂四稀释液	液体3mL×1瓶	2-8℃
标准品	液体1mL×1瓶	2-8℃

### 溶液的配制:

1. 试剂二: 临用前加入5mL蒸馏水混匀,可分装后-20℃保存,避免反复冻融,-20℃保存4周;
2. 试剂四: 临用前按试剂四: 试剂四稀释液=10 μL: 1mL (约40T) 的比例稀释试剂四备用,现用现配,用多少配多少;
3. 标准品: 100 μmol/mL苹果酸标准液。临用前取10 μL 100 μmol/mL苹果酸标准液,加入240 μL蒸馏水,充分混匀,配制成 4 μmol/mL苹果酸标准液;再取100 μL 4 μmol/mL苹果酸标准液,加入900 μL蒸馏水,充分混匀,配制成 0.4 μmol/mL苹果酸标准液使用,现配现用。(实验中每管需要20 μL,为减小实验误差,故配制大体积)。

### 需自备的仪器和用品:

分析天平、研钵/匀浆器/超声波细胞破碎仪、离心机、可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、水



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

浴锅/恒温培养箱、蒸馏水和冰。

### 测定步骤:

#### 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：按照质量（g）：提取液一体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约0.1g，加入1mL提取液一）加入提取液一，冰浴匀浆后于4℃，12000g离心10min，取0.8mL上清液，再缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4℃ 12000g离心10min后取上清待测。
2. 细胞：按照细胞数量（10<sup>6</sup>个）：提取液一（mL）为5~10：1的比例（建议5百万细胞加入1mL提取液一），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；于4℃，12000g离心10min，取0.8mL上清液，再缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4℃ 12000g离心10min后取上清待测。
3. 血清（浆）等液体：取100μL液体加入1mL提取液一，4℃ 12000g离心10min，取0.8mL上清液，再缓慢加入0.15mL 提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，12000g离心10min后取上清待测。

注：提取液二需缓慢加入，加入后会产生大量气泡，建议使用2mL EP管进行操作。

#### 二、测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热30min以上，波长调至450nm，分光光度计用蒸馏水调零。
2. 加样表：（按顺序将下列试剂加在96孔板/1.5mLEP管中）。

试剂名称（μL）	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	20	20	-	-
标准品	-	-	20	-
蒸馏水	-	-	-	20
试剂一	55	80	55	55
试剂二	40	40	40	40
试剂三	60	60	60	60
试剂四	25	-	25	25

充分混匀，于37℃水浴锅/恒温培养箱准确避光反应30min，于450nm处测定吸光值，分别记为A测定，A对照，A标准，A空白，计算ΔA测定=A测定-A对照；ΔA标准=A标准-A空白。每个测定管需设置一个对照管，空白管和标准管只需测定1-2次。

#### 三、苹果酸含量的计算

1. 按照样本蛋白浓度计算

$$\begin{aligned} \text{苹果酸含量} (\mu\text{mol}/\text{mg prot}) &= \Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样本}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \times F \\ &= 0.4 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} \times F \end{aligned}$$

2. 按照样本质量计算

$$\begin{aligned} \text{苹果酸含量} (\mu\text{mol}/\text{g 质量}) &= \Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \times F \\ &= 0.475 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F \end{aligned}$$

3. 按照细胞数量计算

$$\begin{aligned} \text{苹果酸含量} (\mu\text{mol}/10^6 \text{ cell}) &= \Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (N \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \times F \\ &= 0.475 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N \times F \end{aligned}$$

4. 按照液体体积计算

$$\begin{aligned} \text{苹果酸含量} (\mu\text{mol}/\text{mL}) &= \Delta A_{\text{测定}} \times C_{\text{标准}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div [V_{\text{液体}} \times V_{\text{上清}} \div (V_{\text{提取液一}} + V_{\text{液体}})] \times F \\ &= 5.225 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F \end{aligned}$$

C标准：标准管浓度，0.4μmol/mL；V样本：加入的样本体积，0.02mL；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白质

浓度，mg/mL，蛋白浓度需自行测定；V上清：提取时上清液体积，0.8mL；V提取液二：加入提取液二的体积，



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

0.15mL; V提取液一: 加入的提取液一体积, 1mL; N: 细胞数量,  $10^6$ 个; V液体: 液体样本体积, 0.1mL; F: 稀释倍数。

#### 注意事项:

1. 提取液一中含有蛋白质沉淀剂, 因此上清液不能用于蛋白浓度测定。如需测定蛋白含量, 需另取组织。
2.  $\Delta A$ 测定的测定范围在0.01-1之间。如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以用蒸馏水稀释样本后再次测定, 如果测定吸光值小于线性范围吸光值, 需要增加样本量后再次测定, 注意同步计算公式。

#### 实验实例:

1. 取0.1075g香蕉果肉加入1mL提取液一, 冰浴匀浆后离心, 取0.8mL上清后加0.15mL提取液二, 离心取上清后用蒸馏水稀释8倍后按照测定步骤操作, 使用96孔板测得计算,  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.581 - 0.098 = 0.483$ ,  $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.409 - 0.101 = 0.308$ , 按样本质量计算含量得:  
苹果酸含量 ( $\mu\text{mol/g}$  质量) =  $0.475 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 0.475 \times 0.483 \div 0.308 \div 0.1075 \times 8 = 55.43 \mu\text{mol/g}$ 质量。
2. 取0.1033g鼠肝加入1mL提取液一, 冰浴匀浆后离心, 取0.8mL上清后加0.15mL提取液二, 离心取上清后按照测定步骤操作, 使用96孔板测得计算,  $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.271 - 0.118 = 0.153$ ,  $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.409 - 0.101 = 0.308$ , 按样本质量计算含量得:  
苹果酸含量 ( $\mu\text{mol/g}$  质量) =  $0.475 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times F = 0.475 \times 0.153 \div 0.308 \div 0.1033 \times 1 = 2.28 \mu\text{mol/g}$ 质量。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com