



## 苹果酸含量检测试剂盒（WST 显色法）说明书

可见分光光度法

**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：BC5490

规格：50T/24S

**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 30 mL×1 瓶	2-8°C保存
提取液二	液体 5 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C保存
试剂三	液体 12 mL×2 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 50 μL×1 支	2-8°C保存
试剂四稀释液	液体 8 mL×1 瓶	2-8°C保存
标准品	液体 1mL×1 支	2-8°C保存

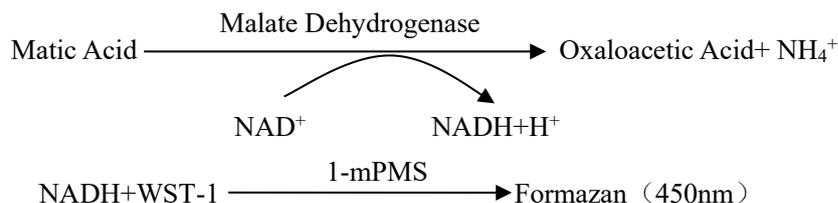
溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入 13 mL 蒸馏水混匀，可分装后-20°C保存，避免反复冻融，-20°C保存 4 周；
2. 试剂四：临用前按试剂四：试剂四稀释液=10μL：1mL（约 8T）的比例稀释试剂四备用，现用现配，用多少配多少；
3. 标准品：100μmol/mL 苹果酸标准液。临用前取 20μL 100μmol/mL 苹果酸标准液，加入 480μL 蒸馏水，充分混匀，配制成 4μmol/mL 苹果酸标准液；再取 100μL 4μmol/mL 苹果酸标准液，加入 900μL 蒸馏水，充分混匀，配制成 0.4μmol/mL 苹果酸标准液使用，现配现用。（实验中每管需要 100μL，为减小实验误差，故配制大体积）。

### 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。

**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、1mL玻璃比色皿、水浴锅/恒温培养箱、蒸馏水和冰。

**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：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：试剂二需缓慢加入，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. 分光光度计预热30min以上，波长调至450nm，蒸馏水调零。
2. 加样表：（按顺序将下列试剂加在EP管中）

试剂名称（μL）	测定管	对照管	标准管	空白管
样本	100	100	-	-
标准品	-	-	100	-
蒸馏水	-	-	-	100
试剂一	265	400	265	265
试剂二	200	200	200	200
试剂三	300	300	300	300
试剂四	135	-	135	135

充分混匀，于 37℃水浴锅/恒温培养箱避光准确反应 30min，取全部反应液到 1mL 比色皿中，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  $\Delta A_{测定} = A_{测定} - A_{对照}$ ； $\Delta A_{标准} = A_{标准} - A_{空白}$ 。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. 按照蛋白含量计算

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

2. 按照样本质量计算

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

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

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

C 标准：标准管浓度，0.4 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ；V样本：加入的样本体积，0.1 $\text{mL}$ ；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白质浓度， $\text{mg}/\text{mL}$ ，蛋白浓度需自行测定；V上清：提取时上清液体积，0.8 $\text{mL}$ ；V提取液二：加入的提取液二体积，0.15 $\text{mL}$ ；V提取液一：加入的提取液一体积，1 $\text{mL}$ ；N：细胞数量， $10^6$ 个；V液体：液体样本体积，0.1 $\text{mL}$ ；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 1 $\text{mL}$  提取液一，冰浴匀浆后离心，取 0.8 $\text{mL}$  上清后加 0.15 $\text{mL}$  提取液二，离心取上清用蒸馏水稀释 8 倍后按照测定步骤操作，使用 1 $\text{mL}$  比色皿测得计算  $\Delta A$  测定=A 测定-A 对照=0.850-0.086=0.764， $\Delta A$  标准=A 标准-A 空白=0.570-0.093=0.477，按样本质量计算含量得：  
苹果酸含量 ( $\mu\text{mol}/\text{g}$  质量) =  $0.475 \times \Delta A$  测定  $\div \Delta A$  标准  $\div W \times F = 56.6174 \mu\text{mol}/\text{g}$  质量。
2. 取 0.1033g 兔肌肉加入 1 $\text{mL}$  提取液一，冰浴匀浆后离心，取 0.8 $\text{mL}$  上清后加 0.15 $\text{mL}$  提取液二，离心取上清后按照测定步骤操作，使用 1 $\text{mL}$  比色皿测得计算  $\Delta A$  测定=A 测定-A 对照=0.313-0.097=0.216， $\Delta A$  标准=A 标准-A 空白=0.570-0.093=0.477，按样本质量计算含量得：  
苹果酸含量 ( $\mu\text{mol}/\text{g}$  质量) =  $0.475 \times \Delta A$  测定  $\div \Delta A$  标准  $\div W \times F = 2.0822 \mu\text{mol}/\text{g}$  质量。
3. 取 100 $\mu\text{L}$  牛血清加入 1 $\text{mL}$  提取液一，离心，取 0.8 $\text{mL}$  上清后加 0.15 $\text{mL}$  提取液二，离心取上清，之后按照测定步骤操作，使用 1 $\text{mL}$  比色皿测得计算  $\Delta A$  测定=A 测定-A 对照=0.147-0.116=0.031， $\Delta A$  标准=A 标准-A 空白=0.570-0.093=0.477，按照液体体积计算含量得：  
苹果酸含量 ( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ) =  $5.225 \times \Delta A$  测定  $\div \Delta A$  标准  $\times F = 0.3395 \mu\text{mol}/\text{mL}$ 。

**相关系列产品：**

- BC0710/BC0715  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶 ( $\alpha$ -KGDH) 活性检测试剂盒
- 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
- BC1060/BC1065 柠檬酸合酶 (CS) 活性检测试剂盒
- BC2200/BC2205 丙酮酸 (PA) 含量检测试剂盒