

草酰乙酸检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1881

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织、细胞、细菌、血清（浆）等液体样本

产品简介

草酰乙酸是三羧酸循环的一个中间产物，是在苹果酸脱氢酶的催化下由苹果酸生成的，它与乙酰辅酶 A 缩合生成柠檬酸，开始新的循环。在丙酮酸羧化酶的作用下，由丙酮酸与 CO₂ 生成，另外，也在转氨酶的作用下由天冬氨酸生成。已知也可作为琥珀酸脱氢酶的抑制剂。本试剂盒提供了一种简单、方便、快速的草酰乙酸含量检测方法，其原理是苹果酸脱氢酶催化草酰乙酸和 NADH 生成苹果酸和 NAD⁺，NADH 在 340nm 处有特征吸收峰，而 NAD⁺ 没有，在 340nm 下测定 NADH 减少的速率可以计算草酰乙酸含量。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃ 保存
试剂一	15mL	30mL	4℃ 保存
试剂二	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20℃ 保存
试剂三	60 μL	120 μL	-20℃ 保存
标准品	粉剂×1 支	粉剂×1 支	-20℃ 保存

自备耗材

酶标仪或分光光度计（能测 340nm 处的吸光度）
 96 孔 UV 板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头
 水浴锅、制冰机，低温离心机
 去离子水
 匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

提取液：即用型；4℃ 保存。
 试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。
 试剂二：临用前配制，对于 48T，在试剂二中加入 10mL 试剂一；对于 96T，在试剂二中加入 20mL 试剂一，充分混匀待用；未用完的试剂分装-20℃ 避光保存，避免反复冻融。
 试剂三：临用前配制，用试剂一进行 1:20 稀释，整个实验过程中，冰上避光放置。现用现配，用多少配多少；-20℃ 保存。
 标准品：含 10mg 草酰乙酸，临用前加入 1mL 去离子水溶解，配制 10mg/mL 标准品分装-20℃ 避光保存，避免反复冻融。
 标准曲线设置：按下表所示，用去离子水将 10mg/mL 标准品稀释为 10、5、2.5、1.25、0.625、0.313、0.156mg/mL 的标准溶液。

	标准品体积 (μL)	去离子水体积 (μL)	标准品浓度 (mg/mL)
标准品 1	200μL 10mg/mL	0	10

产品说明书

标准品 2	100μL of 标准品 1 (10mg/mL)	100	5
标准品 3	100μL of 标准品 2 (5mg/mL)	100	2.5
标准品 4	100μL of 标准品 3 (2.5mg/mL)	100	1.25
标准品 5	100μL of 标准品 4 (1.25mg/mL)	100	0.625
标准品 6	100μL of 标准品 5 (0.625mg/mL)	100	0.313
标准品 7	100μL of 标准品 6 (0.313mg/mL)	100	0.156

注意：每次实验，请使用新配制的标准品。

样本制备

动植物组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，12,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

细胞或细菌：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 提取液，冰浴超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），然后 12,000g，4℃离心 10min，取上清液，置冰上待测。

血清、血浆或其它生物学液体：可直接用来检测，或者如果有必要，建议将样本根据预实验结果用提取液稀释后再进行检测。

注意：建议使用新鲜样本。如果不立即使用，可将样品在-80℃下保存 6 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 340nm。分光光度计去离子水调零。
2. 试剂二于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 10min 以上。
3. 操作表（96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入下列试剂）：

试剂 (μL)	空白孔	标准孔	测定孔	对照孔
样本	0	0	20	20
标准品	0	20	0	0
提取液	20	0	0	20
试剂三	20	20	20	0
试剂二	160	160	160	160

混匀后，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）避光孵育 30min，测定 340nm 处吸光度，空白孔记为 $A_{空}$ ，标准孔记为 $A_{标}$ ，测定孔记为 $A_{测}$ ，对照孔记为 $A_{对}$ 。计算 $\Delta A_{测} = A_{对} - A_{测}$ ， $\Delta A_{标} = A_{空} - A_{标}$ （空白管和标准曲线只需做 1 次）。

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 $\Delta A_{测}$ 小于 0.001 可适当加大样本量。如果 $\Delta A_{测}$ 大于 1.0，样本可用提取液进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

结果计算

标准曲线的绘制

以标准溶液浓度为 y 轴， $\Delta A_{标}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。

2. 草酰乙酸含量的计算

将样本的 $\Delta A_{测}$ 代入方程得到 y 值 (mg/mL)。

(1) 按样本鲜重计算

$$\text{草酰乙酸含量 (mg/g 鲜重)} = y \times V_{样} \div (W \times V_{样} \div V_{样总}) \times n = y \div W \times n$$

(2) 按样本蛋白浓度计算

$$\text{草酰乙酸含量 (mg/mg prot)} = (y \times V_{样}) \div (V_{样} \times C_{pr}) \times n = y \div C_{pr} \times n$$

(3) 按样本体积计算

$$\text{草酰乙酸含量 (mg/mL)} = y \times V_{样} \div V_{样} \times n = y \times n$$

产品说明书

(4) 按细胞数目计算

草酰乙酸含量 ($\mu\text{mol}/10^4\text{ cells}$) = $y \times V_{\text{样}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \times n = y \div 500 \times n = 0.002 \times y \times n$

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02mL; W : 样本质量, g; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; n : 样本稀释倍数; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; 500: 细胞数量, 500 万。

结果展示

典型标准曲线-以下数据和曲线仅供参考, 实验者需根据自己的实验建立标准曲线。

标准品浓度
(mg/mL)

$\Delta A_{\text{标}}$

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验, 尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究, 如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途, 我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用, 并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用; 否则, 可能导致结果异常。
5. 勤换吸头, 避免各组分之间的交叉污染。

相关产品:

- PMK1005 柠檬酸合酶(CS)检测试剂盒(微量法)
- PMK1112 乙酰辅酶A检测试剂盒(微量法)
- PMK1115 乳酸(LA)检测试剂盒(微量法)
- PMK1116 丙酮酸(PA)检测试剂盒(微量法)
- PMK1002 NAD-苹果酸脱氢酶(NAD-MDH)检测试剂盒(微量法)
- PMK1003 NADP-苹果酸脱氢酶(NADP-MDH)检测试剂盒(微量法)
- PMK1015 NADP 苹果酸酶(NADP-ME)检测试剂盒(微量法)
- PMK1016 NAD-苹果酸酶(NAD-ME)检测试剂盒(微量法)
- PMK1015 NADP 苹果酸酶(NADP-ME)检测试剂盒(微量法)
- PMK1114 线粒体苹果酸脱氢酶(MDHm)检测试剂盒(微量法)



更多产品详情了解, 请关注公众号: