

L-Malic Acid Content Assay Kit

苹果酸含量测定试剂盒说明书

货号:BN72142| 方法: 可见分光法 | 规格: 48 样

一、产品简介:

苹果酸 (L-Malic acid) 是三羧酸循环中的一个重要组分, 存在于所有生物体中。

本试剂盒提供一种快速、灵敏的检测苹果酸的方法, 利用苹果酸脱氢酶催化氧化苹果酸, 同时使生成的 NADH 进一步与显色剂反应生成有色物质, 通过检测该有色物质在 450nm 处的生成量即可得出苹果酸的含量。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加入 4.4mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂二	粉体 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加入 5mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂三	液体 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 μL×2 支	-20℃保存	临用前甩几下使微量液体落入底部, 再加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用。溶解后的试剂可-20℃分装冻存。
试剂五	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	粉体 mg×2 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用。溶解后的试剂可-20℃分装冻存。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加入 1.5mL 蒸馏水混匀溶解即得 100μmol/mL 的苹果酸标准品, 再用蒸馏水稀释 500 倍得 0.2 μmol/mL 标准品溶液备用检测。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、可调式移液器、水浴锅、研钵、冰、蒸馏水。

四、苹果酸 (L-Malic acid) 含量测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

取约 0.1g 组织样本 (水分含量高的样本建议取 0.5g 左右), 加 1mL 提取液冰浴研磨, 粗提液全部转移到 EP 管中, 12000rpm, 4℃离心 10min, 上清液待测。

② 细菌/真菌样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液; 冰浴超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3S, 间隔 10S, 重复 30 次); 12000rpm, 4℃离心 10min, 取上清液, 置冰上待测。

【注】：也可按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为 500~1000:1 的比例进行提取。

③ 液体样品：澄清的液体样本直接检测，若浑浊则离心后取上清检测。

2、上机检测：

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 450nm，蒸馏水调零。
- ② 标准品制备：按照备注要求制备浓度为 $0.2\mu\text{mol/mL}$ 的苹果酸标准品。
- ③ 所有试剂需解冻至 37°C 或置于水浴锅(37°C)孵育 5-15min。试剂一和二和三和四可按照 40:40:20:20 比例配成混合液（一枪加 120 μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。
- ④ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μL)	标准管 (仅做一次)	空白管 (仅做一次)	测定管	对照管
样本			80	80
标准品	80			
试剂一	40	40	40	40
试剂二	40	40	40	40
试剂三	20	20	20	20
试剂四	20	20	20	20
试剂五	500	580	500	540
试剂六	40	40	40	

混匀， 37°C 下避光孵育 30min，全部上清液转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 450nm 下读取各管吸光值 A（若此时 A 值增长较大，需延长反应时间，直至 A 值不变）， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、按照样本质量计算：

$$\begin{aligned}\text{苹果酸}(\text{nmol/g 鲜重}) &= (\text{C 标准} \times \text{V 标准}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times D \\ &= 200 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{苹果酸}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= (\text{C 标准} \times \text{V 标准}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times \text{Mr} \times D \\ &= 26.82 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D\end{aligned}$$

2、按照细菌/细胞数量计算：

$$\begin{aligned}\text{苹果酸}(\text{nmol}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{C 标准} \times \text{V 标准}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D \\ &= 200 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div 500 \times D\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{苹果酸}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) &= (\text{C 标准} \times \text{V 标准}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (500 \times V_1 \div V) \times \text{Mr} \times D \\ &= 26.82 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div 500 \times D\end{aligned}$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{苹果酸}(\text{nmol/mL}) = (\text{C 标准} \times \text{V 标准}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D = 200 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

$$\text{苹果酸}(\mu\text{g/mL}) = (\text{C 标准} \times \text{V 标准}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times \text{Mr} \times D = 26.82 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

C 标准--- $0.2\mu\text{mol/mL} = 200\text{nmol/mL}$ ；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入反应体系中样本体积，0.08mL；

V 标准---0.08mL；

W---样本质量，g；

苹果酸分子量 Mr---134.09；

500---细菌或细胞数量，万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。