

苹果酸 (L-Malic acid) 含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-F-S013 分光法 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°C保存	
试剂一	粉体 1 支	4°C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 1 支	4°C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 1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 2 支	-20°C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°C分装冻存。
试剂五	液体 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂六	粉体 2 支	-20°C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°C分装冻存。
标准品	粉体 1 支	4°C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、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, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

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°C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°C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 μ mol/mL 的苹果酸标准品。
- ③ 所有试剂需解冻至室温(25 $^{\circ}$ C)。
- ④ 在 EP 管中依次加入：

试剂名称 (μ L)	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 $^{\circ}$ 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】1. 若 ΔA 在零附近徘徊，可以增加样本加样量 V1（如增至 140 μ L，则试剂五相应减少），或增加样本取样量 W（如取样 0.2g），则改变后的 V1 和 W 需代入计算公式重新计算。
2. 若样本中苹果酸含量过高， ΔA 超过 1，则可对样本用蒸馏水或提取液进行稀释后再按照加样表测定，则稀释倍数 D 需代入计算公式计算。

五、结果计算：

1、按照样本质量计算：

$$\begin{aligned} \text{苹果酸含量(nmol/g 鲜重)} &= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 200 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{苹果酸含量}(\mu\text{g/g 鲜重}) &= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V1 \div V) \times Mr \times D \\ &= 26.82 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D \end{aligned}$$

2、按照细菌/细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{苹果酸含量(nmol}/10^4 \text{ cell)} &= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 200 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div 500 \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{苹果酸含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell)} &= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (500 \times V1 \div V) \times Mr \times D \\ &= 26.82 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div 500 \times D \end{aligned}$$

3、按照液体体积计算：

$$\begin{aligned} \text{苹果酸含量(nmol/mL)} &= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V1 \times D \\ &= 200 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{苹果酸含量}(\mu\text{g/mL)} &= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times Mr \times D \\ &= 26.82 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D \end{aligned}$$

C 标准---0.2 μ mol/mL=200nmol/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。