

苹果酸 (L-Malic acid) 含量测定试剂盒说明书

(货号: G08107F 紫外法 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 NAD⁺ 还原成 NADH, 通过检测 340nm 下 NADH 的增加量, 计算得到苹果酸的含量。

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 60mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加入 2.4mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂二	粉体 mg×1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉体落入底部, 再加入 2.4mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂三	液体 μL×2 支	-20°C保存	临用前甩几下使微量液体落入底部, 再加入 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用。溶解后的试剂可-20°C分装冻存。
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	粉体 mg×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 mg×1 支	4°C保存	仅用来鉴定试剂盒中试剂是否正常 (不参与结果计算)。 配制方法: 用前标准管 (苹果酸) 甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.5mL 蒸馏水混匀溶解即浓度为 100μmol/mL, 再稀释 100 倍成 1μmol/mL 标准品备用; 按照加样表中的测定管操作 (样本更换成备用浓度的标准品)。

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°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 0.2μmol/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 40:40:20:520 比例配成混合液(一枪加 620μL 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)	测定管
样本	80
试剂一	40
试剂二	40
试剂三	20
试剂四	520
混匀，于室温 (25°C) 下孵育 5min 后于 340nm 处读取 A1 值。	
试剂五	40
混匀，于室温 (25°C) 下孵育 20min 后，全部澄清液体转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中，于 340nm 处读取 A2 值(直到 2min 内 A2 值变化小于 0.02)， $\Delta A = A2 - A1$ 。	

五、结果计算：

1、按照样本质量计算：

$$\text{苹果酸}(\mu\text{g/g 鲜重}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr)] \div (W \times V1 \div V) \times D = 199.4 \times \Delta A \div W \times D$$

2、按照细菌/细胞数量计算：

$$\text{苹果酸}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr)] \div (W \times V1 \div V) \times D = 199.4 \times \Delta A \div 500 \times D$$

3、按照液体体积计算：

$$\text{苹果酸}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^6 \times Mr)] \div V1 \times D = 199.4 \times \Delta A \times D$$

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ；

d ---光径，1cm；

V ---加入提取液体积，1 mL；

$V1$ ---加入样本体积，0.08mL；

$V2$ ---反应总体积；0.74mL= $7.4 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

W ---样本质量，g；

Mr ---苹果酸分子量，134.09；

500---细胞数量，万；

D ---稀释倍数，未稀释即为 1。