



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

苹果酸(L-MA)含量试剂盒(酶法-可见显色)

可见分光光度法

货号: R45034-48S

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。

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	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。

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。



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 μ mol/mL 的苹果酸标准品。

③所有试剂需解冻至37℃或置于水浴锅(37℃)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 μ L 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(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℃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)。				

结果计算:

1、按照样本质量计算:

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

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

2、按照细菌/细胞数量计算:

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

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

3、按照液体体积计算:

$$\begin{aligned}\text{苹果酸}(\text{nmol/mL}) &= (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D \\ &= 200 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D\end{aligned}$$

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

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

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入反应体系中样本体积, 0.08mL;

V 标准---0.08mL;



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

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。



源叶