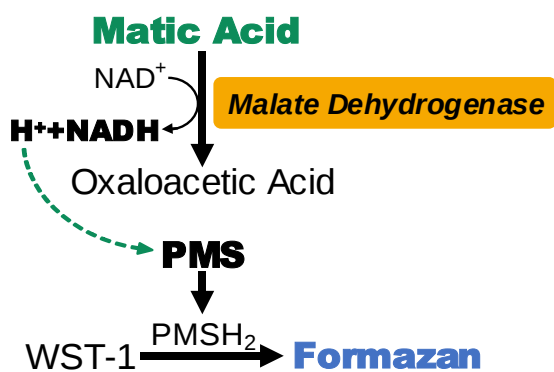




苹果酸含量检测试剂盒

Malic Acid Content Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



苹果酸含量检测试剂盒

Malic Acid Content Assay Kit

一、产品描述

L-苹果酸是三羧酸循环的中间产物，也是苹果酸-天冬氨酸穿梭的重要组成部分，在糖酵解、柠檬酸循环、有氧呼吸、酸碱平衡和抗氧化代谢等过程中具有重要作用，其含量可作为评估能量代谢、氧化应激和酸碱平衡调节等过程的重要指标，并且在医药、农业、工业和食品科学等领域具有广泛应用。

苹果酸脱氢酶能够催化苹果酸和 NAD^+ 生成草酰乙酸、 NADH 和 NH_4^+ ，在 1-mPMS 作用下，WST-1 能够与 NADH 反应生成水溶性甲臃（Formazan），产物在 450 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可定量检测苹果酸的含量。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液 A	液体 60 mL×1 瓶	4°C 保存	-
提取液 B	液体 10 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	粉剂×1 瓶	-20°C 避光保存	使用前加入 6 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后 -20°C 可保存 1 个月，避免反复冻融)
试剂三	液体 10 mL×1 瓶	4°C 避光保存	-
试剂四	粉剂×1 支	-20°C 避光保存	使用前加入 80 μL 试剂五充分溶解 (分装后 -20°C 可保存 1 个月，避免反复冻融)
试剂五	液体 3 mL×1 瓶	4°C 保存	-
标准品	粉剂×1 支	4°C 避光保存	使用前加入 1 mL 蒸馏水充分溶解 (即为 100 $\mu\text{mol/mL}$ 苹果酸标准液)
标准稀释液的制备（现配现用）：使用前将 100 $\mu\text{mol/mL}$ 苹果酸标准液使用蒸馏水稀释至 0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05 $\mu\text{mol/mL}$ 即为标准稀释液。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：酶标仪、96 孔板、研钵/匀浆器、台式离心机、可调式移液器/多道移液器、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.待测样本的制备（可根据预实验结果适当调整样品量及比例）

①组织：按照组织质量（g）：提取液 A 体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液 A）处理样品，冰浴匀浆，4℃ 12000 g 离心 10 min，吸取 800 μ L 上清液至离心管中，加入 150 μ L 提取液 B 充分混匀，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞：离心收集细菌或细胞至离心管内，按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液 A 体积（mL）为（500-1000）：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液 A）处理样品，冰浴超声破碎（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min），4℃ 12000 g 离心 10 min，吸取 800 μ L 上清液至离心管中，加入 150 μ L 提取液 B 充分混匀，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样本：吸取 100 μ L 液体样本加入 1 mL 提取液 A 充分混匀，4℃ 12000 g 离心 10 min，吸取 800 μ L 上清液至离心管中，加入 150 μ L 提取液 B 充分混匀，4℃ 12000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

注：提取液 B 加入后会产生大量气泡，应缓慢加入并吹打混匀至无气泡产生，建议使用 2 mL 离心管。

2.测定步骤

①酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 450 nm。

②检测工作液的制备（现用现配）：使用前根据使用量按试剂四：试剂五=1:100 的体积比配制。

③标准稀释液的制备（现配现用）：使用前将 100 μ mol/mL 苹果酸标准液使用蒸馏水稀释至 0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05 μ mol/mL 即为标准稀释液。

序号	A	1	2	3	4	5	6
稀释前浓度（ μ mol/mL）	100	10	10	10	0.4	0.2	0.1
标准液体积（ μ L）	50	80	60	40	500	500	500
蒸馏水体积（ μ L）	450	920	940	960	500	500	500
稀释后浓度（ μ mol/mL）	10	0.8	0.6	0.4	0.2	0.1	0.05

④在 96 孔板中依次加入下列试剂（避光条件下进行）：

试剂	测定组 (μL)	对照组 (μL)	标准组 (μL)	空白组 (μL)
待测样本	20	20	-	-
标准稀释液	-	-	20	-
蒸馏水	-	-	-	20
试剂一	55	80	55	55
试剂二	40	40	40	40
试剂三	60	60	60	60
检测工作液	25	-	25	25
充分混匀，37℃避光准确反应 30 min				

吸光值测定：测定 450 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 对照、A 标准和 A 空白；计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。注：每个样品均需设一个对照组，各浓度标准组和空白组只需测定 1-2 次。

标准曲线的建立：以 0.8、0.6、0.4、0.2、0.1、0.05 μmol/mL 为横坐标 (x)，以对应的 $\Delta A_{\text{标准}}$ 为纵坐标 (y)，绘制标准曲线，得到标准方程 $y=kx+b$ ，将 $\Delta A_{\text{测定}}$ 代入方程得到 x (μmol/mL)。

3. 苹果酸含量计算

①按组织蛋白含量计算

$$\text{苹果酸含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = \frac{x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提 B}}) \times V_{\text{提 A}}}{C_{\text{pr}} \times W \times V_{\text{上清}}} = \frac{1.1875 \times x}{C_{\text{pr}} \times W}$$

②按组织样本质量计算

$$\text{苹果酸含量 } (\mu\text{mol/g}) = \frac{x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提 B}}) \times V_{\text{提 A}}}{W \times V_{\text{上清}}} = \frac{1.1875 \times x}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

$$\text{苹果酸含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \frac{x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提 B}}) \times V_{\text{提 A}}}{\text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{上清}}} = \frac{1.1875 \times x}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

$$\text{苹果酸含量 } (\mu\text{mol/mL}) = \frac{x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提 B}}) \times (V_{\text{液}} + V_{\text{提 A}})}{V_{\text{液}} \times V_{\text{上清}}} = 13.0625 \times x$$

注释：V 样：反应体系中加入的待测样本的体积，0.02 mL；V 上清：提取过程中吸取上清液的体积，0.8 mL；V 提 A：提取过程中加入提取液 A 的体积，1 mL；V 提 B：提取过程中加入提取液 B 的体积，0.15 mL；V 液：提取过程中加入液体样本的体积，0.1 mL；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白含量，mg/g；细菌或细胞数量：以万计，若 500 万细菌或细胞则代入 500 即可。

四、注意事项

- ①提取液 A 中含有蛋白沉淀组分，待测样本不能用于蛋白含量测定；若使用蛋白浓度计算苹果酸含量，则需要另取样本使用 PBS 或生理盐水按照相同步骤制备为待测样本，再进行蛋白浓度测定；
- ②若 A 测定或 ΔA 测定超出标准吸光值线性范围：高于最高值建议将待测样本使用蒸馏水适当稀释后再进行测定；低于最低值建议制备更高浓度的样本后再进行测定，计算时相应修改；
- ③37°C 准确反应的时间对实验结果有较大影响建议精确控制，测定样本较大时建议分批进行测定，以避免组内反应时间不一致对结果造成影响；
- ④反应体系中试剂不能按比例配制为混合液使用，必须按反应体系顺序依次加入；
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

Notes:

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

