

苹果酸（L-Malic acid）含量测定试剂盒说明书

（微板法 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 mg×1 支 | 4°C保存 | 临用前甩几下使粉体落入底部，再加入 1.2mL 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 1.5mL 蒸馏水充分溶解备用。 |
| 试剂三 | 液体 mL×1 支 | 4°C保存 | |
| 试剂四 | 液体 μ L×1 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 15mL×1 瓶 | 4°C保存 | |
| 试剂六 | 粉体 mg×1 支 | -20°C保存 | 临用前甩几下使粉体落入底部，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。 |
| 标准品 | 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 1.5mL 蒸馏水混匀溶解即得 100 μ mol/mL 的苹果酸标准品，再用蒸馏水稀释 500 倍得 0.2 μ mol/mL 标准品溶液备用检测。 |

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、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 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。
- 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 所有试剂需解冻至室温(25°C)。
- ④ 在 96 孔板中依次加入：

| 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 | | | 20 | 20 |
| 标准品 | 20 | | | |
| 试剂一 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 试剂二 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 试剂三 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 试剂四 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 试剂五 | 130 | 150 | 130 | 140 |
| 试剂六 | 10 | 10 | 10 | |

混匀，37°C条件下，避光反应 30min，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 40μL，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：

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

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

2、按照细菌/细胞数量计算：

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

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

3、按照液体体积计算：

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

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

C 标准---0.2μmol/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，0.02mL;

V 标准---0.02mL;

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。