

## 苹果酸 (L-Malic acid) 含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-S013 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

### 一、指标介绍:

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:

| 试剂组分 | 试剂规格         | 存放温度   | 注意事项                                                                                                                                  |
|------|--------------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 提取液  | 液体 120mL×1 瓶 | 4℃保存   |                                                                                                                                       |
| 试剂一  | 粉体 1 支       | 4℃保存   | 1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩);<br>2. 加入 1.2mL 蒸馏水充分溶解备用;<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。                                                               |
| 试剂二  | 粉体 1 支       | 4℃保存   | 1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩);<br>2. 加入 1.5mL 蒸馏水充分溶解备用;<br>3. 保存周期与试剂盒有效期相同。                                                               |
| 试剂三  | 液体 1 支       | 4℃避光保存 |                                                                                                                                       |
| 试剂四  | 液体 1 支       | -20℃保存 | 1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩);<br>2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用;<br>3. 溶解后的试剂可-20℃分装冻存;                                              |
| 试剂五  | 液体 15mL×1 瓶  | 4℃保存   |                                                                                                                                       |
| 试剂六  | 粉体 1 支       | -20℃保存 | 1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩);<br>2. 加入 0.6mL 蒸馏水充分溶解备用;<br>3. 溶解后的试剂可-20℃分装冻存。                                                             |
| 标准品  | 粉体 1 支       | 4℃保存   | 1. 开盖前注意使粉体落入底部(可手动甩一甩);<br>2. 加入 1mL 蒸馏水混匀溶解即得 100 μmol/mL 的苹果酸标准品;<br>3. 再用蒸馏水稀释 500 倍得 0.2 μmol/mL 标准品溶液备用检测;<br>4. 保存周期与试剂盒有效期相同。 |

### 三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

### 四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

#### 1、样本提取:

##### 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。

③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。

## 2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 450nm。
- ② 标准品制备：按照注意事项要求制备浓度为  $0.2\mu\text{mol/mL}$  的苹果酸标准品。
- ③ 所有试剂需解冻至室温( $25^\circ\text{C}$ )。
- ④ 在 96 孔板中依次加入：

| 试剂组分 ( $\mu\text{L}$ ) | 标准管<br>(仅做一次) | 空白管<br>(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， $37^\circ\text{C}$ 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  $\Delta A$  在零附近徘徊，可以增加样本加样量  $V_1$ （如增至  $40\mu\text{L}$ ，则试剂五相应减少），或增加样本取样量  $W$ （如取样  $0.2\text{g}$ ），则改变后的  $V_1$  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， $\Delta A$  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：

$$\text{苹果酸含量}(\text{nmol/L/g 鲜重}) = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (W \times V_1 \div V) \times D$$

$$= 200 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

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

$$= 26.82 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div W \times D$$

### 2、按样本蛋白浓度计算：

$$\text{苹果酸含量}(\text{nmol/L/g prot}) = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \times D$$

$$= 200 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times D$$

$$\text{苹果酸含量}(\mu\text{g/g prot}) = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \times Mr \times D$$

$$= 26.82 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \times D$$

### 3、按照液体体积计算：

$$\text{苹果酸含量}(\text{nmol/mL}) = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div V_1 \times D$$

$$= 200 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

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

$$= 26.82 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \times D$$

4、按照细菌/细胞数量计算：

$$\text{苹果酸含量(nmol/10}^4 \text{ cell)} = (\text{C 标准} \times \text{V 标准}) \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div (500 \times \text{V1} \div \text{V}) \times \text{D} \\ = 200 \times \Delta A \div (\text{A 标准} - \text{A 空白}) \div 500 \times \text{D}$$

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

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

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入反应体系中样本体积, 0.02mL;

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。

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。