

苹果酸（L-Malic acid）含量测定试剂盒说明书

（货号：BP10407F 分光法 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 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 4.4mL 蒸馏水充分溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉体 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 5mL 蒸馏水充分溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 1 瓶	4℃避光保存	
试剂四	液体 2 支	-20℃保存	每支： 1. 临用前 8000g 4℃离心 2min 使微量液体落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用； 3. 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 2 支	-20℃保存	每支： 1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 1.1mL 蒸馏水充分溶解备用； 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）； 2. 加入 1mL 蒸馏水混匀溶解即得 100μmol/mL 的苹果酸标准品； 3. 再用蒸馏水稀释 500 倍得 0.2 μmol/mL 标准品溶液备用检测； 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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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 分光光度计预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 450nm，蒸馏水调零。

② 标准品制备：按照注意事项要求制备浓度为 0.2μmol/mL 的苹果酸标准品。

③ 所有试剂需解冻至室温(25℃)。

④ 在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	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）。				

【注】 1. 若 ΔA 在零附近徘徊，可以增加样本加样量 V1（如增至 140μL，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：

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

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

2、按样本蛋白浓度计算：

$$\text{苹果酸含量 (nmol/g prot)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V1 \times Cpr) \times D \\ = 200 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div Cpr \times D$$

$$\text{苹果酸含量(μg/g prot)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标准}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div (V1 \times Cpr) \times Mr \times D \\ = 26.82 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}) \div Cpr \times D$$

3、按照液体体积计算：

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

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

4、按照细菌/细胞数量计算：

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

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

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, 0.08mL;

V 标准---0.08mL;

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。