

## 苹果酸 (L-Malic acid) 含量测定试剂盒说明书

(货号: G08107W48 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 NAD 还原成 NADH, 通过检测 340nm 下 NADH 的增加量, 计算得到苹果酸的含量。

### 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 60mL×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 0.65mL 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 0.7mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂三	液体 μL×1 支	-20°C保存	临用前甩几下使微量液体落入底部, 再加 0.6mL 蒸馏水溶解备用。溶解后的试剂可-20°C分装冻存。
试剂四	液体 10mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	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	仅用来鉴定试剂盒中试剂是否正常 (不参与结果计算)。 配制方法: 用前标准管 (苹果酸) 甩几下使粉剂落入底部, 再加 1.5mL 蒸馏水混匀溶解即浓度为 100 μmol/mL, 再稀释 100 倍成 1 μmol/mL 标准品备用; 按照加样表中的测定管操作 (样本更换成备用浓度的标准品)。

### 三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅、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°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 340nm。
- 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 37°C 或置于水浴锅(37°C)孵育 5-15min。试剂一和二和三和四可按照 10:10:10:140 比例配成混合液（一枪加 170μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。
- ④ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	20
试剂一	10
试剂二	10
试剂三	10
试剂四	140
混匀，于室温（25°C）下孵育5min后于340nm处读取A1值。	
试剂五	10
混匀，于室温（25°C）下孵育20min后于340nm处读取A2值(直到2min内A2值变化小于0.02)， ΔA=A2-A1。	

## 五、结果计算：

### 1、按照样本质量计算：

$$\text{苹果酸}(\mu\text{g/g 鲜重})=[(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6 \times Mr)] \div (W \times V_1 \div V) \times D = 431.16 \times \Delta A \div W \times D$$

### 2、按照细菌/细胞数量计算：

$$\text{苹果酸}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell})=[(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6 \times Mr)] \div (W \times V_1 \div V) \times D = 431.16 \times \Delta A \div 500 \times D$$

### 3、按照液体体积计算：

$$\text{苹果酸}(\mu\text{g}/\text{mL})=[(\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^6 \times Mr)] \div V_1 \times D = 431.16 \times \Delta A \times D$$

ε---NADH 摩尔消光系数，6.22×10<sup>3</sup> L/mol/cm；

d---96 孔板光径，0.5cm；

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.02mL；

V2---反应总体积；0.2mL=2×10<sup>-4</sup>L；

W---样本质量，g；

Mr---苹果酸分子量，134.09；

500---细胞数量，万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。