

苹果酸（L-Malic acid）含量测定试剂盒说明书

（微板法 96 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℃ 保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加入 2.2mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂二	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	临用前甩几下使粉体落入底部，再加入 3mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂三	液体 mL×1 支	4℃ 保存	
试剂四	液体 μL×1 支	-20℃ 保存	临用前甩几下使微量液体落入底部，再加入 2.2mL 蒸馏水充分溶解备用。
试剂五	液体 30mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂六	粉体 mg×1 支	-20℃ 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。
标准品	液体×1 支	4℃ 保存	原浓度是 100μmol/mL 的 L-苹果酸，临用前用蒸馏水稀释 500 倍，即 0.2 μmol/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℃ 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。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 450nm。

② 标准品的稀释：原浓度为 100μmol/mL 的 L-苹果酸，用蒸馏水稀释 500 倍，即得待测标准品浓度为 0.2μmol/mL 的 L-苹果酸。

③ 所有试剂需解冻至室温(25℃)。

④ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	标准管	空白管	测定管	对照管
-----------	-----	-----	-----	-----

	(仅做一次)	(仅做一次)		
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℃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）， $\Delta A=A$ 测定-A 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 40 μ L，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

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

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

2、按照液体体积计算：

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

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

C 标准---0.2 μ 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；

D---稀释倍数。