（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

**产品货号：E-BC-K905-M**

**产品规格：96T(40 samples)**

**检测仪器：酶标仪(445-465 nm)**

# Elabscience®苹果酸比色法测试盒

# Malic Acid Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测血清、血浆、动植物组织及细胞样本中的苹果酸含量。

## 检测原理

L-苹果酸(L-malic acid)广泛存在于生物体中,又名 2-羟基丁二酸，有两种立体异构体，是生物体重要的代谢循环-三羧酸循环的成员之一。苹果酸在自然界中以三种形式存在，D-苹果酸、L-苹果酸以及混合物 DL-苹果酸。其中 L-苹果酸是最常见的异构体。本试剂盒的检测原理是酶催化苹果酸产生草酰乙酸，与此同时底物生成的产物在电子耦合剂的作用下将显色剂还原生成橙黄色产物，在 450 nm 左右检测有最大吸收峰。

## 提供试剂和物品

| 编号 | 名称 | 规格 (Size)(96 T) | 保存方式 (Storage) |
|---|---|---|---|
| 试剂一 (Reagent 1) | 缓冲液 (Buffer Solution) | 20 mL×1 瓶 | -20ºC 保存 6 个月 |
| 试剂二 (Reagent 2) | 酶试剂 (Enzymatic Reagent) | 0.3 mL×1 支 | -20ºC 避光 保存 6 个月 |
| 试剂三 (Reagent 3) | 显色剂 (Chromogenic Agent) | 2.4 mL×1 瓶 | -20ºC 避光 保存 6 个月 |
| 试剂四 (Reagent 4) | 底物 (Substrate) | 粉剂×2 支 | -20ºC 避光 保存 6 个月 |
| 试剂五 (Reagent 5) | 0.5 mmol/L 标准品溶液 (0.5 mmol/L Standard Solution) | 5 mL×1 瓶 | -20ºC 避光 保存 6 个月 |
| | 96 孔酶标板 | 1 板 | |
| | 96 孔覆膜 | 2 张 | |
| | 样本位置标记表 | 1 张 | |

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

## 所需自备物品

**仪器：**酶标仪(445-465 nm，最佳检测波长 450 nm)、37ºC 恒温箱

**试剂：**双蒸水，生理盐水(0.9 % NaCl)

**耗材：**10KD 超滤管(100-500 μL)

## 试剂准备

① 检测前，试剂盒中的试剂平衡至室温。

② 试剂二工作液的配制：

将试剂二:试剂一按体积比=1：19配制，现配现用，按需配制，避光待用。

③ 试剂四工作液的配制：

向试剂四中加入1.5 mL双蒸水，溶解混匀，未用完的试剂在-20 ℃保存7天。

④ 工作液的配制：

将试剂二工作液：试剂四工作液:试剂一按体积比=1：1：4配制，避光待用，现配现用。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

| 编号 | ① | ② | ③ | ④ | ⑤ | ⑥ | ⑦ | ⑧ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **标准品浓度(mmol/L)** | **0** | **0.10** | **0.15** | **0.20** | **0.30** | **0.35** | **0.40** | **0.50** |
| **0.5 mmol/L 标准品(μL)** | 0 | 40 | 60 | 80 | 120 | 140 | 160 | 200 |
| **双蒸水(μL)** | 200 | 160 | 140 | 120 | 80 | 60 | 40 | 0 |

## 样本准备

### ① 样本处理

组织样本匀浆：按照组织样本质量(g)：生理盐水(0.9% NaCl)体积(mL)=1：9的比例匀浆，4ºC，10000 ×g离心10 min。取100-500 μL上清，加入到10 KD超滤管，12000 ×g离心15 min，取外管中的滤液待测。

血清(浆)样本：取100-500 μL，加入到10 KD超滤管，12000 ×g离心15 min，取外管中的滤液待测。

细胞样本：按照细胞个数($10^6$)：生理盐水(0.9%NaCl)体积(mL)=5：1的比例匀浆，4ºC，10000 ×g离心10 min。取100-500 μL上清液，加入到10 KD超滤管，12000 ×g离心15 min，取外管中的滤液待测。

### ② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.003-0.5 mmol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

| 样本 | 稀释倍数 | 样本 | 稀释倍数 |
|---|---|---|---|
| 10%大鼠肝组织 | 3-5 | 10%土豆组织 | 5-12 |
| 10%小鼠肝组织 | 3-5 | 大鼠血清 | 不稀释 |
| 10%柠檬组织 | 8-12 | 小鼠血浆 | 不稀释 |
| 10%橘子组织 | 5-10 | $3.35\times10^6$ CHO 细胞 | 不稀释 |

注：稀释液为生理盐水(0.9 %NaCl)。

## 操作步骤

① 标准孔:取 20 μL 不同浓度的标准品溶液,分别加入相应的酶标孔中。
测定孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。
对照孔：取 20 μL 待测样本加入相应的酶标孔中。

② 向步骤①中标准孔和测定孔加入 120 μL 工作液,向对照孔加入 120 μL 试剂一。

③ 向步骤②中各孔加入 20 μL 试剂三。

④ 振板 5 s,37 ℃ 避光孵育 30 min 后酶标仪 450 nm 波长下测定各孔 OD 值。

## 操作表

| | 标准孔 | 测定孔 | 对照孔 |
|---|---|---|---|
| 不同浓度的标准品溶液(μL) | 20 | -- | -- |
| 待测样本(μL) | -- | 20 | 20 |
| 工作液(μL) | 120 | 120 | -- |
| 试剂一(μL) | -- | -- | 120 |
| 试剂三(μL) | 20 | 20 | 20 |
| 振板 5 s,37 ℃ 避光孵育 30 min 后酶标仪 450 nm 波长下测定各孔 OD 值。 | | | |

## 结果计算

**标准品拟合曲线：y = ax + b**

**① 血清（浆）中苹果酸含量计算公式：**

$$\text{苹果酸含量 (mmol/L)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \times f$$

**② 组织样本中苹果酸含量计算公式：**

$$\text{苹果酸含量 (mmol/kg wet weight)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div (m \div V) \times f$$

**③ 细胞样本中苹果酸含量计算公式：**

$$\text{苹果酸含量 (mmol/10^6)} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div (n \div V) \times f$$

**注解：**

y：标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 时的 OD 值)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

$\Delta A_{450}$：测定 OD 值-对照 OD 值（$\Delta A_{450} = A_{测定} - A_{对照}$）

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

m：匀浆样本的质量，g

V：匀浆液体积，mL

n：细胞个数，$10^6$ 个

# 附录1 关键数据

## 1.技术参数

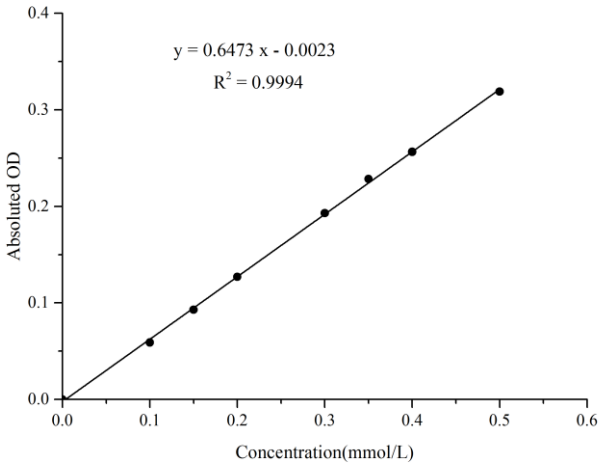
| | | | |
|---|---|---|---|
| **检测范围** | 0.003-0.5 mmol/L | **批间差** | 4.6-5.9 % |
| **灵敏度** | 0.003 mmol/L | **批内差** | 2.6-3.6 % |
| **回收率** | 96-101 % | | |

## 2.标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量20 μL，按照操作步骤进行实验，OD值如下表所示：

| **标准品浓度 (mmol/L)** | **0** | **0.10** | **0.15** | **0.20** | **0.30** | **0.35** | **0.40** | **0.50** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **OD 值** | 0.064 | 0.123 | 0.158 | 0.190 | 0.258 | 0.289 | 0.319 | 0.383 |
| | 0.063 | 0.122 | 0.155 | 0.191 | 0.255 | 0.295 | 0.321 | 0.382 |
| **平均 OD 值** | 0.064 | 0.123 | 0.157 | 0.191 | 0.257 | 0.292 | 0.320 | 0.383 |
| **绝对 OD 值** | 0 | 0.059 | 0.093 | 0.127 | 0.193 | 0.229 | 0.257 | 0.319 |

② 绘制标曲(如下图)：



# 附录2 实例分析

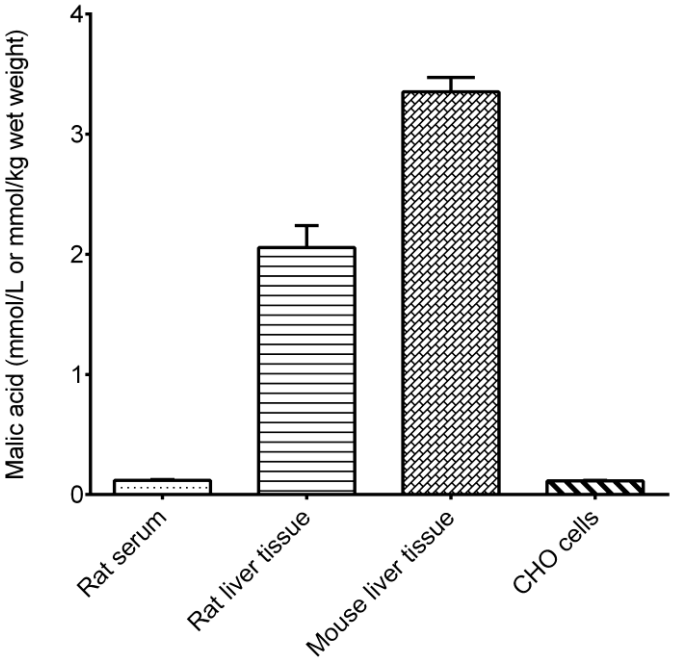
**例如小鼠肝组织(数据仅供参考):**

取稀释4倍的10 %小鼠肝组织匀浆20 μL加入到酶标板孔中，按操作表操作，结果如下：标准曲线：y = 0.6473 x - 0.0023，样本测定OD值为0.120，样本对照OD值为0.081，$\Delta A_{450} = A_{测定} - A_{对照} = 0.120 - 0.081 = 0.039$，计算结果为：

$$苹果酸含量(mmol/kg\ wet\ weight) = (0.039 + 0.0023) \div 0.6473 \div (0.1 \div 0.9) \times 4$$

$$= 2.297\ mmol/kg\ \ wet\ weight$$

按说明书操作，测定大鼠血清(加样量20 μL)、大鼠肝组织(10 %组织匀浆，稀释4倍，加样量20 μL)、小鼠肝组织(10 %组织匀浆，稀释4倍，加样量20 μL)、CHO细胞($3.35\times10^6$个，加样量20 μL)中的苹果酸含量(如下图)：



# 附录3 问题答疑

| 问题 | 可能原因 | 建议解决方案 |
| --- | --- | --- |
| 标准品不成线性 | 标准品浓度稀释错误 | 按照标准品稀释表重新标准品 |
| | 计算错误 | 按照计算公式进行计算 |
| | 使用过期的试剂 | 选择在保质期内的试剂 |
| 样本测不出值 | 样本保存时间过长或者保存不当 | 取新鲜样本，重新检测 |

## 声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。