

柠檬酸 (CA) 含量检测试剂盒说明书

(货号: ADS-F-S019 分光法 48 样)

有效期: 3 个月

测定意义:

CA 是生物体内常见的有机酸, 是重要的食品风味物质。此外, CA 是三羧酸循环第一步反应的产物。

测定原理:

酸性条件下, 柠檬酸还原 Cr^{6+} 生成 Cr^{3+} , 在 545nm 处有特征吸收峰; 通过测定 545nm 吸光值的增加, 即可计算出样品中柠檬酸含量。

自备仪器和用品:

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

试剂组成和配置:

试剂一: 液体 90ml×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 液体 10ml×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂三: 液体 110μl×1 支, -20℃ 保存。

试剂四: 粉剂×1 瓶, 室温保存。临用前配制, 加入 5mL 试剂一, 充分溶解。

试剂五: 液体 5ml×1 瓶, 4℃ 避光保存。

标准品: 液体 1ml×1 支, 250μmol/L 柠檬酸标准液, 4℃ 保存。

样品中柠檬酸提取:

1. 液体样品中柠檬酸提取: 取 0.1mL 液体加试剂一 0.9mL, 充分混匀, 11000g, 4℃ 离心 10min, 取上清液, 待测。

2. 组织中柠檬酸提取: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一) 进行冰浴匀浆。11000g, 4℃ 离心 10min, 取上清置冰上待测。

3. 线粒体中柠檬酸提取: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一) 进行冰浴匀浆, 600g/min, 4℃ 离心 5min; 取上清至另一 EP 管中, 11000g, 4℃ 离心 10min, 弃上清 (此上清液可用于细胞质 CA 含量测定); 向沉淀中加试剂二 200μl, 以及试剂三 2μl, 充分悬浮溶解, 11000g, 4℃ 离心 10min, 取上清液, 待测。

4. 细菌、真菌中: 按照细胞数量 (10⁴ 个): 试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一), 冰浴超声波破碎细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 11000g, 4℃ 离心 10min, 取上清置冰上待测。

测定:

1. 分光光度计预热 30 min 以上, 调节波长到 545 nm, 蒸馏水调零。

2. 试剂一置于 30℃ 水浴中预热 30min 以上。

3. 空白管: 取 EP 管, 依次加入 100μL 蒸馏水, 700μL 试剂一, 100μL 试剂四, 100μL 试剂五, 混匀后室温静置 30min, 于 545nm 测定吸光度, 记为 A 空白管。

4. 标准管: 取 EP 管, 依次加入 100μL 标准液, 700μL 试剂一, 100μL 试剂四, 100μL 试剂五, 混匀后室温静置 30min, 于 545nm 测定吸光度, 记为 A 标准管。

5. 测定管: 取 EP 管, 依次加入 100μL 上清液, 700μL 试剂一, 100μL 试剂四, 100μL 试剂五, 充分混匀后室温静置 30min, 于 545nm 测定吸光度, 记为 A 测定管。

柠檬酸含量计算:

1. 按液体样品的体积计算

柠檬酸含量 (nmol/mL)

$$= [C \text{ 标准液} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \times \text{样品稀释倍数} \times V \text{ 总}$$
$$= 2500 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

C 标准液: 250 μ mol/L=250 nmol/mL; 样品稀释倍数: (0.1 mL 样品+0.9mL 试剂一) \div 0.1 mL 样品=10; V 总: 1mL。

2. 按组织质量计算

柠檬酸含量 (nmol/g 鲜重)

$$= [C \text{ 标准液} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \times V \text{ 总} \div W$$
$$= 250 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$$

C 标准液: 250 μ mol/L=250 nmol/mL; V 总: 上清液总体积, 1.0 mL; W: 样品质量, g。

3. 按蛋白含量计算

柠檬酸含量 (nmol/mg prot)

$$= [C \text{ 标准液} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \div Cpr$$
$$= 250 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div Cpr$$

C 标准液: 250 μ mol/L=250 nmol/mL; Cpr: 上清液蛋白质含量, mg/mL。

4. 按细胞数量计算

柠檬酸含量 (nmol/10⁴ cell)

$$= [C \text{ 标准液} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \times V \text{ 总} \div \text{细胞数量}$$
$$= 250 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

C 标准液: 250 μ mol/L=250 nmol/mL; V 总: 上清液总体积, 1.0 mL。