

柠檬酸含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-S002-96 微板法 96 样)

一、产品简介:

柠檬酸是一种重要的有机酸,是重要的食品风味物质。同时,也是三羧酸循环第一步反应的产物。

本试剂盒提供一种特异性酶法检测柠檬酸含量,利用柠檬酸裂解酶分解柠檬酸生成草酰乙酸,苹果酸脱氢酶催化草酰乙酸生成乳酸,同时使 NADH 转化为 NAD⁺,通过测定 NADH 在 340nm 处吸光值的减少量,进而计算出样品中柠檬酸含量。

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°C保存	
试剂一	粉剂 4 支	-20°C保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部,每支再加 0.3mL 蒸馏水溶解备用,用不完的试剂分装后-20°C保存,禁止反复冻融,三天内用完。
试剂二	粉剂 1 支	-20°C保存	临用前甩几下或离心,使粉剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解备用
试剂三	25mL 液体×1 瓶	4°C保存	
试剂四	粉剂 1 支	4°C避光保存	临用前甩几下或离心,使粉剂落入底部,再加 0.55mL 蒸馏水溶解备用

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、可调式移液枪、研钵和蒸馏水。

四、柠檬酸含量测定:

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、样本提取:

- ① 组织样本: 0.1g 组织样本(水分充足的样本建议取 0.2g 左右),加 1mL 的提取液研磨,粗提液全部转移到 EP 管中,12000rpm,常温离心 10min,上清液待测。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例提取

- ② 细菌/真菌样本:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;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(功率 300w,超声 3 秒,间隔 7 秒,总时间 3min);12000rpm,常温离心 10min,取上清置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照细菌/真菌数量(10⁴个):提取液体积(mL)为 500~1000:1 的比例提取

- ③ 液体样品:澄清液体样本可直接检测。若浑浊,离心后取上清检测。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30 min,调节波长到 340 nm。
- ② 所有试剂解冻至室温(25°C)。
- ③ 在 96 孔板中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管	空白管(仅做一次)
样本	10	
蒸馏水		10

试剂一	10	10
试剂二	10	10
试剂三	165	165
混匀，室温（25℃）下，反应 10min 后于 340nm 处读取 A1。		
试剂四	5	5
混匀，室温（25℃）下，反应 20min 于 340nm 处读取各管的 A2 值（若 A 值继续减少，需延长反应时间，直至 2 分钟内的吸光值保持不变）， $\Delta A = (A1 - A2)$ 测定 - $(A1 - A2)$ 空白。		

- 【注】1. 检测是否反应完全，在反应 20min 后要读值的时候，可改用时间扫描：3min，间隔 1min，依此判读反应是否完全。然后再读取各测定管的 A2 值。
2. 若 A1 值超过 1.5，可以减少试剂一的量（如 6 μ L），则试剂三相应增加；或减少样本量（如 5 μ L），则试剂三相应增加；则改变后的 V1 需代入公司重新计算。
3. 若 ΔA 的差值较小，可增加样本量（如 20 μ L），则试剂三相应减少。则改变后的 V1 需代入公司重新计算。若 ΔA 差值大于 0.4，需将样本稀释，稀释倍数 D 需代入计算公式计算。

五、结果计算：

1、按组织质量计算：

$$\text{柠檬酸含量(mg/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d)] \times V2 \times 10^3 \times Mr \div (W \times V1 \div V) = 1.23 \times \Delta A \div W$$

2、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{柠檬酸含量(mg/10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d)] \times V2 \times 10^3 \times Mr \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \\ &= 1.23 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

3、按液体样品的体积计算：

$$\text{柠檬酸含量(mg/mL)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d)] \times V2 \times 10^3 \times Mr \div V1 = 1.23 \times \Delta A$$

ϵ ---NADH 的摩尔吸光系数为 $6.3 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

d---光径距离，0.5cm;

V---提取液体积，1mL;

V1---样本体积，10 μ L=0.01mL;

V2---反应总体积，200 μ L= 2×10^{-4} L;

Mr---柠檬酸分子量，192.1;

W---样本质量，g;

最低检测线---5mg/L。