

柠檬酸含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-S002-48 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 2 支	-20℃ 保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 每支再加 0.3mL 蒸馏水溶解备用; 3. 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂二	粉剂 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 0.55mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	15mL 液体×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	粉剂 1 支	4℃ 避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 加入 0.28mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本(例如不同类型或分组)进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

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 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。

- ③ 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(10^4 个): 提取液体积(mL)为 500~1000: 1 的比例提取

2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30 min (等仪器过自检程序亦可), 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:

试剂组分 (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°C) 下, 反应 10min 后于 340nm 处读取 A1。		
试剂四	5	5
混匀, 室温 (25°C) 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 6μL), 则试剂三相应增加; 或减少样本量 (如 5μL), 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 20μL), 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、按蛋白浓度计算:

$$\begin{aligned} \text{柠檬酸含量 (mg/mgprot)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d)] \div (V1 \times Cpr \div V) \\ &= 1.23 \times \Delta A \div Cpr \end{aligned}$$

3、按液体样品的体积计算:

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

4、按细胞数量计算:

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

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, $10\mu\text{L} = 0.01\text{mL}$;

V2---反应总体积, $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}\text{L}$;

Mr---柠檬酸分子量, 192.1;

W---样本质量, g;

最低检测线---5mg/L。

细胞数量---万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。