

异柠檬酸含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-S011 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

异柠檬酸是柠檬酸的异构体, 虽然量少, 但广泛存在于生物界。在落地生根属等多汁植物的叶、或悬钩子类中特别多, 也是三羧酸循环中的一个成分。

本试剂盒提供一种特异性酶法检测异柠檬酸含量, 利用异柠檬酸脱氢酶使异柠檬酸和 NADP^+ 生成 α -酮戊二酸、二氧化碳和 NADPH, 通过测定 NADPH 在 340nm 处吸光值的增加量, 进而计算出样品中异柠檬酸含量。

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 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂二	粉剂 1 支	-20℃ 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 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 1.045mL 蒸馏水溶解备用, 可分装冻存。

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 0.5g 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℃)。
- ③ 先做 2-4 样本的预测定, 确定适合本批样本的最适取样质量 (W) 和样本加样量 (V1)。
- ④ 在 96 孔板中依次加入:

试剂组分 (μL)	测定管	空白管
样本	10	
试剂一	170	180
试剂二	10	10
混匀, 37℃条件下, 10min 后于 340nm 处读取各管 A1		
试剂三	10	10
混匀, 37℃条件下, 反应 30min 后于 340nm 处读取各管 A2 值, 若值继续增加可延长反应时间, 每隔 2min 读值 (直至 2min 内值不变为止), $\Delta A = (A2 - A1) - \text{测定} - (A2 - A1) \text{空白}$ 。		

【注】：若 ΔA 过小, 可以增加样本取样质量 (如0.2g), 或增加样本量 (如40μL, 则试剂一相应减少)。调整后的样本质量W和样本量体积V1需代入计算公式重新计算。

五、结果计算:

1、按组织质量计算:

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

2、按样本蛋白浓度计算:

$$\text{异柠檬酸含量 (mg/mg prot)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d)] \div (V1 \times Cpr) = 1.23 \times \Delta A \div Cpr$$

3、按液体样品的体积计算:

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

4、按细胞数量计算:

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

ϵ ---NADPH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---异柠檬酸分子量, 192.1;

W---样本质量, g;

最低检测线---5mg/L。

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。

细胞数量---万;