

柠檬酸含量测定试剂盒说明书

(货号: BP10404F-48 紫外法 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°C 保存	
试剂一	粉剂 4 支	-20°C 保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底(可手动甩一甩); 2. 每支再加 0.55mL 蒸馏水溶解备用; 3. 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	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	50mL 液体×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	粉剂 1 支	4°C 避光保存	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 0.55mL 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)、1ml 石英比色皿、离心管、紫外分光光度计、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 紫外分光光度计预热 30 min（等仪器过自检程序亦可），调节波长到 340 nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。
- ③ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	空白管（仅做一次）
样本	30	
蒸馏水		30
试剂一	40	40
试剂二	20	20
试剂三	620	620
混匀，室温（25℃）下，反应 10min 后于 340nm 处读取 A1，		
试剂四	10	10
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（如 20μL），则试剂三相应增加；或减少样本量（如 20μL），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 50μL），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：

$$\text{柠檬酸含量(mg/g 鲜重)} = [\Delta A \div (\epsilon \times d)] \times V2 \times 10^3 \times Mr \div (W \times V1 \div V) = 0.732 \times \Delta A \div W$$

2、按蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{柠檬酸含量(mg/mg prot)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d)] \div (V1 \times Cpr \div V) \\ &= 0.732 \times \Delta A \div Cpr \end{aligned}$$

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：

$$\begin{aligned} \text{柠檬酸含量(mg/10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d)] \times V2 \times 10^3 \times Mr \div (\text{细胞数量} \times V1 \div V) \\ &= 0.732 \times \Delta A \div \text{细胞数量} \end{aligned}$$

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

d---光径距离，1cm；

V---提取液体积，1mL；

V1---样本体积，30μL=0.03mL；

V2---反应总体积，720μL= $7.2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

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。