Citric Acid (CA) Content Assay Kit

柠檬酸含量测定试剂盒说明书

货号：G0837F | 方法：紫外分光法 | 规格：24 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 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×2 支	-20℃保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部，每支再加 0.55mL 蒸馏水溶解备用，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 mg×1 支	-20℃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
试剂三	20mL 液体×1 瓶	4℃保存	
试剂四	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下或离心，使粉剂落入底部，再加 0.28mL 蒸馏水溶解备用

三、所需的仪器和用品：

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿（光径 1cm）、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（10^4 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 紫外分光光度计预热 30 min，调节波长到 340 nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。

For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.
本产品仅供科研使用，不得用于临床诊断或治疗。

③ 在 1mL 石英比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂名称（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），ΔA=（A1-A2）测定-（A1-A2）空白。		

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算：

1、按组织质量计算：

柠檬酸含量(mg/g 鲜重)=[ΔA÷(ε×d)]×V2×10^3×Mr÷(W×V1÷V)=0.732×ΔA÷W

2、按细胞数量计算：

柠檬酸含量(mg/10^4 cell)=[ΔA÷(ε×d)]×V2×10^3×Mr÷(细胞数量×V1÷V)

=0.732×ΔA÷细胞数量

3、按液体样品的体积计算：

柠檬酸含量(mg/mL)=[ΔA÷(ε×d)]×V2×10^3×Mr÷V1=1.23×ΔA

ε---NADH的摩尔吸光系数为6.3×10^3L/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=7.2×10^{-4}L；　Mr---柠檬酸分子量，192.1；
W---样本质量，g；　最低检测线---5mg/L。

For research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.
本产品仅供科研使用，不得用于临床诊断或治疗。