

## 柠檬酸含量测定试剂盒说明书

(货号: G0837W 微板法 48 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<sup>+</sup>,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 60mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	粉剂 mg×2 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 mg×1 支	-20°C 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	15mL 液体×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	粉剂 mg×1 支	-20°C 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:

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(10<sup>4</sup>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°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。		

## 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:

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

$\epsilon$ ---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。