

## 柠檬酸含量测定试剂盒说明书

(微板法 96 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 120mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×4 支	-20℃保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部，每支再加 0.3mL 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 1.1mL 蒸馏水溶解备用
试剂三	25mL 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 0.55mL 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℃）。  
 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℃）下，反应 10min 后于 340nm 处读取 A1。		
试剂四	5	5
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 - $(A1 - A2)$ 对照。		

- 【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 6 $\mu$ L），则试剂三相应增加；或减少样本量（如 5 $\mu$ L），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  $\Delta A$  的差值较小，可增加样本量（如 20 $\mu$ L），则试剂三相应减少。则改变后的 V1 需代入公司重新计算。若  $\Delta A$  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 $\mu$ L=0.01mL;

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

Mr---柠檬酸分子量，192.1;

W---样本质量，g;

最低检测线---5mg/L。