

## 异柠檬酸含量测定试剂盒说明书

(微板法 96 样)

### 一、产品简介：

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<sup>+</sup>生成 $\alpha$ -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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 15mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，再加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用，
试剂三	液体 $\mu$ L×1 支	-20℃保存	临用前甩几下使液体落入底部，再加入 0.95mL 蒸馏水溶解备用，可分装冻存。

### 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、异柠檬酸含量测定：

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 0.5g 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 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 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：

试剂名称（ $\mu$ L）	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）， $\Delta A=(A2-A1)$ 测定-(A2-A1)空白。		

【注】：若 $\Delta A$ 过小，可以增加样本取样质量（如0.2g），或增加样本量（如40 $\mu$ L，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：

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

### 3、按液体样品的体积计算：

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

$\epsilon$ ---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 $\mu$ L=0.01mL；

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

Mr---异柠檬酸分子量，192.1；

W---样本质量，g；

最低检测线---5mg/L。