

Citric Acid (CA) Content Assay Kit

柠檬酸含量测定试剂盒说明书

货号:BN72400 | 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 (10⁴ 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例提取

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℃)。

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）， $\Delta A = (A1 - A2)$ 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：

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

2、按细胞数量计算：

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

3、按液体样品的体积计算：

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

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， $30\mu\text{L} = 0.03\text{mL}$ ；

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

Mr---柠檬酸分子量，192.1；

W---样本质量，g；

最低检测线---5mg/L。