

## 异柠檬酸含量检测试剂盒（微量法）

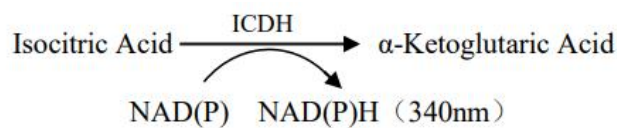
产品货号：BA2264

产品规格：100T/96S

### 产品说明：

异柠檬酸（Isocitric Acid）是柠檬酸的异构体，在许多水果和蔬菜以及由这些原料制成的食品中发现了大量的异柠檬酸盐。生物能够利用的是D型异柠檬酸，是三羧酸循环中的一个成分。

异柠檬酸在异柠檬酸脱氢酶（ICDH，EC1.1.1.41）的作用下变成 $\alpha$ -酮戊二酸，同时NAD(P)还原为NAD(P)H，据此可以计算异柠檬酸含量。



注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

### 产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液一	液体110mL×1瓶	2-8℃
提取液二	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体250 $\mu$ L×1支	2-8℃
试剂三	粉剂×1支	2-8℃
粉剂一	粉剂×1瓶	2-8℃
标准品	粉剂×1支	2-8℃

### 溶液的配制：

1. 试剂二工作液：临用前先离心，根据样本量按试剂二：蒸馏水=10  $\mu$ L：90  $\mu$ L（共100  $\mu$ L，约5T）的比例配制后使用，现配现用。
2. 试剂三：临用前加入1.3mL蒸馏水充分溶解，未用完的试剂-20℃分装保存4周，避免反复冻融。
3. 标准品：临用前加入1mL蒸馏水充分溶解成20  $\mu$ mol/mL异柠檬酸标准品。
4. 工作液：临用前根据样本量按试剂一：试剂二工作液：试剂三=150  $\mu$ L：20  $\mu$ L：10  $\mu$ L（共180  $\mu$ L，约1T）配成工作液后使用，现配现用。

### 自备材料：

紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96孔UV板、天平、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

### 测定步骤：

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织：按照质量（g）：提取液一体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约0.1g，加入1mL提取液一）加入提



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

取液一，冰浴匀浆后于4°C，12000g离心10min，取0.8mL上清液，再缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4°C 12000g离心10min后取上清待测。（提取液二需缓慢加入，加入后会产生大量气泡，建议使用2mL EP管进行操作。）

2. 细菌或细胞：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ $10^6$ 个）：提取液体积（mL）为5~10：1的比例（建议 $5 \times 10^6$ 个细胞加入1mL提取液一），冰浴超声波破碎细胞（功率300w，超声3秒，间隔7秒，总时间3min）；于4°C，12000g离心10min，取0.8mL上清液，再缓慢加入0.15mL提取液二，缓慢吹打混匀至无气泡产生，4°C 12000g离心10min后取上清待测。（提取液二需缓慢加入，加入后会产生大量气泡，建议使用2mL EP管进行操作。）
3. 果汁等液体：取500 $\mu$ L液体样本，加1mg粉剂一混匀后沸水浴5min（缠封口膜，防止爆盖），静置至室温后于4°C 12000g离心10min，取上清待测。

## 二、测定步骤

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，分光光度计用蒸馏水调零。
2. 工作液37°C预热10min以上。
3. 标准品的稀释：将20 $\mu$ mol/mL异柠檬酸标准品用蒸馏水进行稀释得到12、10、8、4、2、1、0.5 $\mu$ mol/mL标准品备用。
4. 标准品稀释表

序号	稀释前浓度 ( $\mu$ mol/mL)	标准品体积 ( $\mu$ L)	蒸馏水体积 ( $\mu$ L)	稀释后浓度 ( $\mu$ mol/mL)
1	20	300	200	12
2	20	300	300	10
3	10	400	100	8
4	8	200	200	4
5	4	200	200	2
6	2	200	200	1
7	1	200	200	0.5

备注：下述实验中每个标准管需20 $\mu$ L标准品（注意不要在此步骤直接检测标准品吸光度）。

5. 样本测定（在微量石英比色皿/96孔UV板中加入下列试剂）

试剂名称 ( $\mu$ L)	测定管	标准管	空白管
样本	20	-	-
标准品	-	20	-
蒸馏水	-	-	20
工作液	180	180	180

充分混匀，立即测定340nm下10s时的吸光度A1，然后迅速置于37°C反应10min（酶标仪有控温功能的可以将温度调至37°C），测定10min10s时的吸光度A2，分别记为A1测定、A2测定、A1标准、A2标准、A1空白、A2空白。计算 $\Delta A$ 标准=(A2标准-A1标准)-(A2空白-A1空白)， $\Delta A$ 测定=(A2测定-A1测定)-(A2空白-A1空白)。每个标准管和空白管只需测1-2次。

## 三、异柠檬酸含量计算公式

### 1. 标准曲线的绘制：

根据标准管的浓度（x， $\mu$ mol/mL）和吸光度 $\Delta A$ 标准（y， $\Delta A$ 标准），建立标准曲线。根据标准曲线，将 $\Delta A$ 测定（y， $\Delta A$ 测定）带入公式计算样本浓度（x， $\mu$ mol/mL）。

### 2. 异柠檬酸含量计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

$$\text{异柠檬酸含量} (\mu\text{mol/g prot}) = x \times V_{\text{样本}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样本}}) \times F = x \div \text{Cpr} \times F$$

(2) 按样本质量计算：



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

异柠檬酸含量 ( $\mu\text{mol/g}$  质量) =  $x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (W \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \times F = 1.1875 \times x \div W \times F$

(3) 按细菌或细胞数量计算:

异柠檬酸含量 ( $\mu\text{mol}/10^6$  cell) =  $x \times (V_{\text{上清}} + V_{\text{提取液二}}) \div (N \times V_{\text{上清}} \div V_{\text{提取液一}}) \times F = 1.1875 \times x \div N \times F$

(4) 按液体体积计算:

异柠檬酸含量 ( $\mu\text{mol/mL}$ ) =  $x \times F$

V样本: 加入的样本体积, 0.02mL; V上清: 提取时上清液体积, 0.8mL; V提取液二: 加入提取液二的体积, 0.15mL; V提取液一: 加入的提取液一体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; N: 细胞数量, 以百万计; F: 稀释倍数。

#### 注意事项:

1. 最好两个人同时做此实验, 一个人比色, 一个人计时, 以保证实验结果的准确性。
2. 若样本  $\Delta A < 0.005$ , 可适当增大样本量后测定; 若样本  $\Delta A > 1.0$  或  $A_{\text{测定}} > 1.5$ , 可用蒸馏水稀释上清液后测定, 注意同步修改计算公式中的稀释倍数。
3. 提取液一中含有蛋白质沉淀剂, 因此上清液不能用于蛋白浓度测定, 如需测定蛋白浓度, 需另取组织。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com