



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

异柠檬酸(ICA)含量试剂盒(酶法)

紫外分光光度法

货号: R45029-24S/48S

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⁺生成 α -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。

试剂盒的组成和配制:

试剂名称	R45029-24S	保存要求	备注
提取液	液体30mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	液体30mL×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0.6mL蒸馏水溶解备用
试剂三	液体 μ L×1支	-20℃保存	临用前甩几下使液体落入底部, 再加入0.45mL蒸馏水溶解备用, 可分装冻存。

试剂名称	R45029-48S	保存要求	备注
提取液	液体60mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	液体30mL×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 μ 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。

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、水浴锅、研钵和蒸馏水。



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(10^4 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紫外分光光度计预热30 min, 调节波长到340nm, 蒸馏水调零。

②所有试剂解冻至室温(25℃)或于水浴锅(25℃)中孵育15-30min。

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 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
样本	60	
试剂一	600	600
试剂二	20	20
混匀, 37℃条件下, 10min后于340nm处读取各管A1		
试剂三	20	20
混匀, 37℃条件下, 反应15min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。		



结果计算:

1、按组织质量计算:

$$\begin{aligned}\text{异柠檬酸含量 (mg/g鲜重)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d)] \times V_2 \times 10^3 \times Mr \div (W \times V_1 \div V) \\ &= 0.36 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

2、按细胞数量计算:

$$\begin{aligned}\text{异柠檬酸含量 (mg/10}^4\text{cell)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d)] \times V_2 \times 10^3 \times Mr \div (\text{细胞数量} \times V_1 \div V) \\ &= 0.36 \times \Delta A \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

3、按液体样品的体积计算:

$$\begin{aligned}\text{异柠檬酸含量 (mg/mL)} &= [\Delta A \div (\epsilon \times d)] \times V_2 \times 10^3 \times Mr \div V_1 \\ &= 0.36 \times \Delta A\end{aligned}$$

ϵ ---NADPH的摩尔吸光系数为 $6.3 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$;

d ---光径距离, 5cm;

V ---提取液体积, 1mL;

V_1 ---样本体积, $60 \mu\text{L} = 0.06\text{mL}$;

V_2 ---反应总体积, $700 \mu\text{L} = 7 \times 10^{-4}\text{L}$;

Mr --- 异柠檬酸分子量, 192.1;

W --- 样本质量, g;

最低检测线---5mg/L。