

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0389

Size: 100T/96S

柠檬酸 (CA) 含量检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

CA 是生物体内常见的有机酸, 是重要的食品风味物质。此外, CA 是三羧酸循环第一步反应的产物。

二、测定原理:

酸性条件下, 柠檬酸还原 Cr^{6+} 生成 Cr^{3+} , 在 545nm 处有特征吸收峰; 通过测定 545nm 吸光值的增加, 即可计算出样品中柠檬酸含量。

三、需自备的仪器和用品:

低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体×2 瓶	4℃保存	-
试剂二	液体×1 瓶	4℃保存	-
试剂三	液体×1 管	-20℃保存	-
试剂四	粉剂×1 管	室温保存	临用前配制, 加入 2mL 试剂一, 充分溶解
试剂五	液体×1 管	4℃避光保存	-
标准品	液体×1 管	4℃保存	250 $\mu\text{mol/L}$ 柠檬酸标准液

五、样品中柠檬酸提取：

1. 液体样品中柠檬酸提取：取 0.1mL 液体加试剂一 0.9mL，充分混匀，11000g，4°C 离心 10min，取上清液，待测。
2. 组织中柠檬酸提取：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆。11000g，4°C 离心 10min，取上清置冰上待测。
3. 线粒体中柠檬酸提取：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一）进行冰浴匀浆，600g/min，4°C 离心 5min；取上清至另一 EP 管中，11000g，4°C 离心 10min，弃上清（此上清液可用于细胞质 CA 含量测定）；向沉淀中加试剂二 200 μ l，以及试剂三 2 μ l，充分悬浮溶解，11000g，4°C 离心 10min，取上清液，待测。
4. 细菌、真菌中：按照细胞数量 (10^4 个)：试剂一体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3 秒，间隔 7 秒，总时间 3min）；11000g，4°C 离心 10min，取上清置冰上待测。

六、测定操作：

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min，调节波长到 545nm，蒸馏水调零。
2. 试剂一置于 30°C 水浴中预热 30min。
3. 空白管：取 0.5mL EP 管，依次加入 20 μ L 蒸馏水，140 μ L 试剂一，20 μ L 试剂四，20 μ L 试剂五，混匀后室温静置 30min，于 545nm 测定吸光度，记为 A 空白管。
4. 标准管：取 0.5 mL EP 管，依次加入 20 μ L 标准液，140 μ L 试剂一，20 μ L 试剂四，20 μ L 试剂五，混匀后室温静置 30min，于 545nm 测定吸光度，记为 A 标准管。
5. 测定管：取 0.5 mL EP 管，依次加入 20 μ L 上清液，140 μ L 试剂一，20 μ L 试剂四，20 μ L 试剂五，充分混匀后室温静置 30min，于 545nm 测定吸光度，记为 A 测定管。

注意：空白管和标准管只需测定一次。

七、计算公式：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1. 按液体样品的体积计算

柠檬酸含量 (nmol/L) = [C 标准液 × (A 测定管 - A 空白管) ÷ (A 标准管 - A 空白管)] × 样品
稀释倍数 × V 总 = 2500 × (A 测定管 - A 空白管) ÷ (A 标准管 - A 空白管)

C 标准液：250 μmol/L = 0.25 mmol/L；

样品稀释倍数：(0.1 mL 样品 + 0.9 mL 试剂一) ÷ 0.1 mL 样品 = 10；V 总：1 mL。

2. 按组织质量计算

柠檬酸含量 (nmol/g) = [C 标准液 × (A 测定管 - A 空白管) ÷ (A 标准管 - A 空白管)] × V 总
÷ W = 250 × (A 测定管 - A 空白管) ÷ (A 标准管 - A 空白管) ÷ W

C 标准液：250 μmol/L；V 总：上清液总体积，1.0 mL = 0.001 L；W：样品质量，g。

3. 按蛋白含量计算

柠檬酸含量 (nmol/mg prot) = [C 标准液 × (A 测定管 - A 空白管) ÷ (A 标准管 - A 空白管)]
÷ Cpr = 250 × (A 测定管 - A 空白管) ÷ (A 标准管 - A 空白管) ÷ Cpr

C 标准液：250 μmol/L = 0.25 μmol/mL；Cpr：上清液蛋白质含量，mg/mL。

4. 按细胞数量计算

柠檬酸含量 (nmol/10⁴ cell) = [C 标准液 × (A 测定管 - A 空白管) ÷ (A 标准管 - A 空白管)]
× V 总 ÷ 细胞数量 = 250 × (A 测定管 - A 空白管) ÷ (A 标准管 - A 空白管) ÷ 细胞数量

C 标准液：250 μmol/L；V 总：上清液总体积，1.0 mL = 0.001 L；

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按液体样品的体积计算

柠檬酸含量 (nmol/L) = [C 标准液 × (A 测定管 - A 空白管) ÷ (A 标准管 - A 空白管)] × 样
品稀释倍数 × V 总 = 2500 × (A 测定管 - A 空白管) ÷ (A 标准管 - A 空白管)

C 标准液：250 μmol/L = 0.25 mmol/L；

样品稀释倍数：(0.1 mL 样品+0.9mL 试剂一) ÷ 0.1 mL 样品=10；V 总：1mL。

2. 按组织质量计算

柠檬酸含量(nmol/g)=[C 标准液×(A 测定管-A 空白管)÷(A 标准管-A 空白管)]×V 总
÷W= 250×(A 测定管-A 空白管)÷(A 标准管-A 空白管) ÷W

C 标准液：250 μmol/L；V 总：上清液总体积，1.0 mL=0.001 L；W：样品质量，g。

3. 按蛋白含量计算

柠檬酸含量(nmol/mg prot)=[C 标准液×(A 测定管-A 空白管)÷(A 标准管-A 空白管)]
÷Cpr= 250×(A 测定管-A 空白管)÷(A 标准管-A 空白管) ÷Cpr

C 标准液：250 μmol/L=0.25 μmol/mL；Cpr：上清液蛋白质含量，mg/mL。

4. 按细胞数量计算

柠檬酸含量(nmol/10⁴cell)=[C 标准液×(A 测定管-A 空白管)÷(A 标准管-A 空白管)]
×V 总÷细胞数量= 250×(A 测定管-A 空白管) ÷(A 标准管-A 空白管) ÷细胞数量

C 标准液：250 μmol/L；V 总：上清液总体积，1.0 mL=0.001 L；

八、注意事项：

1. 样品处理等过程均需要在冰上进行。
2. 试剂四需现配现用，配置好的一周内使用完；
3. 试剂五为易致癌物质，实验过程中，需佩戴手套，避免试剂五溅到皮肤上。
4. 柠檬酸提取液不能用于蛋白含量测定，如需测定蛋白含量，需另取组织，使用本公司 BCA 蛋白质含量测定试剂盒（货号：ZC-S0470）进行测定。