

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-S0662

Size: 50T/48S

## 柠檬酸 (CA) 检测试剂盒说明书

### 可见分光光度法

\*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  $\text{Cr}^{6+}$  生成  $\text{Cr}^{3+}$ , 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:

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、研钵/匀浆器、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

#### 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 90mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 10mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 0.1mL × 1 支	-20°C 保存	
试剂四	粉剂 × 1 瓶	室温保存	临用前配制, 加入 5mL 试剂一, 充分溶解
试剂五	液体 5mL × 1 瓶	4°C 避光保存	
标准品	液体 1mL × 1 支	4°C 保存	1mmol/L 柠檬酸标准液, 临用前用水稀释成 250μmol/L 柠檬酸标准液。

## 五、操作步骤：

### ● 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/min 4℃离心 10min，取上清液，待测。

(2) 组织中柠檬酸提取：称约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一，冰上充分研磨，11000g/min 4℃离心 10min，取上清液，待测。

(3) 线粒体中柠檬酸提取：称约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一，冰上充分研磨，600g/min，4℃离心 5min；取上清至另一 EP 管中，11000g/min，4℃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 200μL，以及试剂三 2μL，充分悬浮溶解，11000g/min，4℃离心 10min，取上清液，待测。

### ● 测定：

1. 分光光度计预热 30 min 以上，调节波长到 545 nm，蒸馏水调零。
2. 试剂一置于 30℃水浴中预热 30min 以上。
3. 按下表在 1.5mLEP 管中加入相应试剂

试剂名称 (μL)	空白管	测定管	标准管
蒸馏水	100		
上清液		100	
标准品			100
试剂一	700		
试剂四	100		
试剂五	100		
充分混匀后室温静置 30min，于 545nm 测定吸光度，记为 A 空白管、A 测定管、A 标准管。			

## 六、柠檬酸含量计算：

### 1. 按液体样品的体积计算：

$$\text{柠檬酸含量 (mmol/L)} = [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times F$$
$$= 2.5 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$$

C 标准液：标准品的浓度， $250\mu\text{mol/L}=0.25\text{ mmol/L}$ ；F：样本稀释倍数， $(0.1\text{ mL 样品}+0.9\text{mL 试剂一}) \div 0.1\text{ mL 样品}=10$ 。

### 2. 按组织鲜重计算：

$$\text{柠檬酸含量 } (\mu\text{ mol/g 鲜重}) = [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times V_{\text{总}} \div W$$
$$= 0.25 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div W$$

C 标准液：标准品的浓度， $250\mu\text{ mol/L}$ ；V 总：上清液总体积， $1.0\text{mL}=0.001\text{L}$ ；W：样品质量，g。

### 4. 按线粒体蛋白含量计算：

$$\text{柠檬酸含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times V_{\text{样}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}})$$
$$= 0.25 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{Cpr}$$

C 标准液：标准品的浓度， $250\mu\text{mol/L}=0.25\mu\text{mol/mL}$ ；V 样：加入的样本体积， $100\mu\text{L}=0.1\text{mL}$ ；Cpr：上清液蛋白浓度，mg/mL。

## 七、注意事项：

- (1) 样品处理等过程均需要在冰上进行。
- (2) 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。
- (3) 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。若反应 30min 后有明显的黑色小颗粒，属于正常现象，需将样本稀释后再测。

