

上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 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

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。

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。

自备仪器和用品：

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。

试剂组成和配置：

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 μmol/L 柠檬酸标准液

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℃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℃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℃离心5min；取上清至另一EP管中，11000g，4℃离心10min，弃上清（此上清液可用于细胞质CA含量测定）；向沉淀中加试剂二200 μl，以及试剂三2 μl，充分悬浮溶解，11000g，4℃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℃离心10min，取上清置冰上待测。

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℃水浴中预热 30min。
3. 空白管: 取0.5mL EP管, 依次加入20 μL蒸馏水, 140 μL试剂一, 20 μL试剂四, 20 μL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 μL标准液, 140 μL试剂一, 20 μL试剂四, 20 μL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 μL上清液, 140 μL试剂一, 20 μL试剂四, 20 μL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。

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

$$\text{柠檬酸含量 (nmol/L)} = [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times \text{样品稀释倍数} \times V_{\text{总}} = 2500 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$$

C 标准液: 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

$$\text{柠檬酸含量 (nmol/g)} = [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times V_{\text{总}} \div W = 250 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div W$$

C 标准液: 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

$$\text{柠檬酸含量 (nmol/mg prot)} = [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \div \text{Cpr} = 250 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{Cpr}$$

C 标准液: 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

$$\text{柠檬酸含量 (nmol/10}^4\text{cell)} = [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times V_{\text{总}} \div \text{细胞数量} = 250 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

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**

3. 按液体样品的体积计算

$$\text{柠檬酸含量 (nmol/L)} = [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times \text{样品稀释倍数} \times V_{\text{总}} = 2500 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})$$

C 标准液: 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。

4. 按组织质量计算

$$\text{柠檬酸含量 (nmol/g)} = [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times V_{\text{总}} \div W = 250 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div W$$

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

5. 按蛋白含量计算

$$\text{柠檬酸含量 (nmol/mg prot)} = [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \div \text{Cpr}$$
$$\text{Cpr} = 250 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{Cpr}$$

C 标准液: 250  $\mu\text{mol/L}$  = 0.25  $\mu\text{mol/mL}$ ; Cpr: 上清液蛋白质含量, mg/mL。

6. 按细胞数量计算

$$\text{柠檬酸含量 (nmol}/10^4\text{cell)} = [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times \text{V总} \div \text{细胞数量}$$
$$= 250 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

C 标准液: 250  $\mu\text{mol/L}$ ; V 总: 上清液总体积, 1.0 mL = 0.001 L;

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试剂盒进行测定。