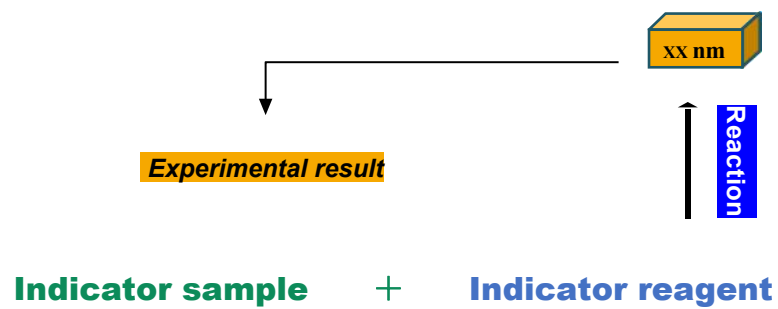


上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

柠檬酸（CA）含量检测试剂盒说明书

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

产品内容：

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℃保存	—
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	—
试剂三	液体 0.1mL×1 支	-20℃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℃避光保存	
标准品	液体 1mL×1 支	4℃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。

产品说明：

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。

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：

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。

操作步骤：

一、样品中柠檬酸提取：

- 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。
- 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。

- c. 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。

二、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。			

三、柠檬酸含量计算：

1. 按液体样品的体积计算：

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

$$= 2.5 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

C 标准液：标准品的浓度，250μmol/L=0.25 mmol/L；F：样本稀释倍数，(0.1 mL 样品+0.9mL 试剂一) ÷ 0.1 mL 样品=10。

2. 按组织鲜重计算：

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

$$= 0.25 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$$

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

3. 按线粒体蛋白含量计算：

$$\text{柠檬酸含量 (μmol/mg prot)}$$

$$= [C \text{ 标准液} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \times V \text{ 样} \div (Cpr \times V \text{ 样})$$

$$= 0.25 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div Cpr$$

C 标准液：标准品的浓度，250 μmol/L=0.25μmol/mL；V 样：加入的样本体积，100μL=0.1mL；Cpr：上清液蛋白浓度，mg/mL。

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 试剂盒进行测定。

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