

柠檬酸(CA)含量检测试剂盒说明书

Citric Acid Assay Kit

微量法

货号：AK315

规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
AK315-A	100 mL×2 瓶	4℃保存
AK315-B	20 mL×1 瓶	4℃保存
AK315-C	0.25 mL×1 支	-20℃保存
AK315-D	粉剂×1 瓶	室温保存；临用前配制，加入 2mL AK315-A 充分溶解，一周内使用完
AK315-E	2 mL×1 瓶	4℃避光保存
AK315-标准品	1ml×1 支	250μmol/L 柠檬酸标准液，4℃保存

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：柠檬酸 (Citric Acid, CA) 是一种重要的有机酸，又名枸橼酸，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 是三羧酸循环反应系统中，由草酰乙酸加入乙酰辅酶 a 的乙酰基而形成的产物。

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。

自备用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

样本的前处理：

1. 液体样品：取 0.1mL 液体加 AK315-A 0.9mL，充分混匀，11000g，4℃离心 10min，取上清液，待测。
2. 组织：按照组织质量 (g)：AK315-A 体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL AK315-A）进行冰浴匀浆。11000g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。
3. 线粒体：按照组织质量 (g)：AK315-A 体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL AK315-A）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 AK315-B 200μl，以及 AK315-C 2μl，充分悬浮溶解，11000g，4℃离心 10min，取上清液，待测。
4. 细胞：按照细胞数量 (10^4 个)：AK315-A 体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细胞加入 1mL AK315-A），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。

测定步骤

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min，调节波长到 545 nm，蒸馏水调零。
2. 将 AK315-A 置于 30℃水浴中预热 30min。

3. 在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂：

试剂名称	空白管 (μL)	标准管 (μL)	测定管 (μL)
蒸馏水	20		
标准液		20	
上清液			20
AK315-A	140	140	140
AK315-D	20	20	20
AK315-E	20	20	20

充分混匀后室温静置 30min，于 545nm 测定吸光度，记为：A 空白管，A 标准管，A 测定管。

注意：空白管和标准管各需测定 1-2 次。

柠檬酸(CA)计算公式：

1. 按液体样品的体积计算：

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

注： C 标准液：250 μmol/L = 0.25 mmol/L；样品稀释倍数：(0.1 mL 样品+0.9mL AK315-A)÷0.1 mL 样品=10

2. 按组织质量计算：

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

注： 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：

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

注： 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

$$\text{柠檬酸含量 (μmol/10}^4 \text{ cell)} = [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times \text{V 总} \div \text{细胞数量} \\ = 0.25 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{细胞数量}$$

注： C 标准液：250 μmol/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. AK315-D 需现配现用，配置好的一周内使用完；
3. AK315-E 为易致癌物质，实验过程中，需佩戴手套，避免溅到皮肤上；
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；
5. 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。