

柠檬酸 (citric acid, CA) 含量测定试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注 意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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：

试剂一：液体×1 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，250 $\mu\text{mol/L}$ 柠檬酸标准液，4℃ 保存。

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

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

C 标准液：250μmol/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

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

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

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

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

4. 按细胞数量计算

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

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

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

C 标准液: 250 μ mol/L=0.25 m mol/L; 样品稀释倍数: (0.1 mL 样品+0.9mL 试剂一) \div 0.1 mL 样品=10; V 总: 1mL。

2. 按组织质量计算

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

C 标准液: 250 μ mol/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

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

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

6. 按细胞数量计算

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

C 标准液: 250 μ 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。