

## 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  $\text{Cr}^{6+}$  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。

### 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 瓶，室温保存。**临用前配制，加入 2.5mL 试剂一，充分溶解。**

试剂五：液体×1 瓶，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：

- 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。
- 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。
- 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 $\mu\text{l}$ ，以及试剂三 2 $\mu\text{l}$ ，充分悬浮溶解，11000g，4℃ 离心 10min，取上清液，待测。
- 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：

- 分光光度计/酶标仪预热 30 min，调节波长到 545 nm，蒸馏水调零。
- 试剂一置于 30℃ 水浴中预热 30min。
- 空白管**：取 0.5 mL EP 管，依次加入 20 $\mu\text{L}$  蒸馏水，140 $\mu\text{L}$  试剂一，20 $\mu\text{L}$  试剂四，20 $\mu\text{L}$  试剂五，混匀后室温静置 30min，于 545nm 测定吸光度，记为 A 空白管。
- 标准管**：取 0.5 mL EP 管，依次加入 20 $\mu\text{L}$  标准液，140 $\mu\text{L}$  试剂一，20 $\mu\text{L}$  试剂四，20 $\mu\text{L}$  试剂五，混匀后室温静置 30min，于 545nm 测定吸光度，记为 A 标准管。
- 测定管**：取 0.5 mL EP 管，依次加入 20 $\mu\text{L}$  上清液，140 $\mu\text{L}$  试剂一，20 $\mu\text{L}$  试剂四，20 $\mu\text{L}$  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

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

C 标准液：250 $\mu\text{mol/L}$ =250 nmol/mL；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

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

C 标准液：250 $\mu\text{mol/L}$ =250 nmol/mL；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

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

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

4. 按细胞数量计算

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

C 标准液：250 $\mu\text{mol/L}$ =250 nmol/mL；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

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

C 标准液：250 $\mu\text{mol/L}$ =250 nmol/mL；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。

4. 按组织质量计算

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

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

6. 按细胞数量计算

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

C 标准液: 250 $\mu$ mol/L=250 nmol/mL; 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。