

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。

自备实验用品及仪器：

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 μ L上清液，140 μ L试剂一，20 μ L试剂四，20 μ 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。

柠檬酸 (citric acid, CA) 含量测定试剂盒说明书计算公式：

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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。

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。

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。

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；

b.使用96孔板测定的计算公式如下

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。

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。

按蛋白含量计算

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

$$= 250 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div C_{\text{pr}}$$

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

按细胞数量计算

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

$$= 250 \times (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) \div (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \div \text{细胞数量}$$

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

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。