北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www. bjoka- vip. com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

柠檬酸（CA）含量检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：D17272

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 120 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 22 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 0.25 mL×1 支	-20℃保存
试剂四	粉剂×2 支	常温保存
试剂五	液体 3 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

1、 试剂三：为易挥发试剂，用完后尽快密封，-20℃保存；

2、 试剂四：临用前取 1 支加入 1.5 mL 试剂一，充分溶解，用不完的试剂 2-8℃保存 2 周。

3、 标准品：2 μmol/mL 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，即可计算出样本中柠檬酸含量。

$$Cr^{6+} \xrightarrow{CA} Cr^{3+} \longrightarrow \text{Chromium Citrate Chelate(545nm)}$$

技术指标：

最低检出限：0.04 μmol/mL

线性范围：0.05-5 μmol/mL

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

需自备的仪器和用品：

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

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、 液体样本中柠檬酸提取：取 0.1mL 液体加试剂一 0.9mL，充分混匀，11000g，4℃离心 10min，取上清液置于冰上待测。（若测定值较低，可适当调整液体样本和试剂一的体积比例，如0.2mL 液体样本+0.8mL 试剂一）或（0.5mL 液体样本+0.5mL 试剂一）。）

2、 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积(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。10000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

3、 细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（10^4 个）：试剂一体积（mL）为500~1000：1 的比例（建议500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；10000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

4、 **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，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 200μL，以及试剂三 2μL，充分悬浮溶解，11000g，4℃离心 10min，取上清液置于冰上待测。

二、测定步骤

1、 分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长到545nm，分光光度计蒸馏水调零。

2、 试剂一置于30℃水浴中预热30min以上。

3、操作表（按下表在1.5mLEP管/96孔板管中加入相应试剂）：

试剂名称（μL）	空白管	测定管	标准管
蒸馏水	20	-	-
上清液	-	20	-
标准品	-	-	20
试剂一	140	140	140
试剂四	20	20	20
试剂五	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测定管、A标准管，计算ΔA测定=A测定管-A空白管，ΔA标准=A标准管-A空白管。空白管和标准管只需测定1-2次。			

三、柠檬酸含量计算

1、 按液体体积计算：

柠檬酸含量（μmol/mL）= C标准液×ΔA测定÷ΔA标准×F= 20×ΔA测定÷ΔA标准

2、 按组织质量计算：

柠檬酸含量（μmol/g 质量）= C标准液×ΔA测定÷ΔA标准×V总÷W = 2×ΔA测定÷ΔA标准 ÷W

3、 按细胞/细菌数量计算：

柠檬酸含量（μmol/10^4 cell）= C标准液×ΔA测定÷ΔA标准×V总÷N=2×ΔA测定÷ΔA标准÷N

4、 按蛋白浓度计算：

柠檬酸含量（μmol/mg prot）= C标准液×ΔA测定÷ΔA标准 ×V样÷（Cpr×V样）= 2×ΔA测定÷ΔA标准÷Cpr

C标准液：标准品的浓度，2μmol/mL；F：样本稀释倍数， 0.1mL样本+0.9mL试剂一）÷0.1mL样本=10；V总：上清液总体积，1.0mL；W：样本质量，g；N：细胞/细菌数量，以万计；Cpr：上清液蛋白浓度，mg/mL，需自行测定；V样：加入的样本体积，20μL=0.02 mL。

注意事项：

1、样本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、柠檬酸试剂一不能用于蛋白含量测定，如需测定蛋白含量，需另取组织进行测定。

4、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。

5、如果样本吸光值大于0.5（96孔板）或1.0（比色皿），建议将样本用试剂一稀释后进行测定。

实验实例：

1、 取 0.1065g 竹子叶片加入 1mL 试剂一，冰上充分研磨，11000g 4℃离心 10min，取上清液按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管=0.185-0.109=0.076，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管= 0.292-0.109=0.183，按样本质量计算得：

柠檬酸含量（μmol/g 质量）=2×ΔA 测定÷ΔA 标准÷W =7.80 μmol/g 质量。

2、 取 0.1094g 兔肾脏组织加入 1mL 试剂一，冰上充分研磨，11000g 4℃离心 10min，取上清液按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管=0.270-0.109=0.161，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管= 0.292-0.109= 0.183，按样本质量计算得：

柠檬酸含量（μmol/g 质量）=2×ΔA 测定÷ΔA 标准 ÷W= 16.08 μmol/g 质量。

3、 取 0.1mL 小鼠血清加试剂一 0.9mL，充分混匀，11000g 4℃离心 10min，取上清液按照测定步骤操作，使用96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管= 0.174-0.109=0.065，ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.292-0.109 =0.183，按液体样本的体积计算：

柠檬酸含量（μmol/mL）=20×ΔA 测定÷ΔA 标准=7.10 μmol /mL。