

柠檬酸（CA）含量检测试剂盒（分光光度法）

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。

试剂组成和配制：

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 支，-20℃ 保存；

试剂四：粉剂×1 瓶，室温保存。临用前配制，加入 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 支，250 $\mu\text{mol/L}$ 柠檬酸标准液，4℃ 保存。

样品处理：

- 液体样品：**取 0.1mL 液体试剂一 0.9mL，充分混匀，11000g，4℃ 离心 10min，取上清液待测。
- 组织：**按照组织质量（g）：提取液体（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：**按照组织质量（g）：提取液体（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，取上清置另一 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）向沉淀中加入试剂二 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。
- 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。

测定步骤：

- 分光光度计预热 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 EP 管，依次加入 100 μL 蒸馏水，700 μL 试剂一，100 μL 试剂四，100 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。

- 标准管：取 EP 管，依次加入 **100μL 标准液** 700μL 试剂一，100μL 试剂四 100μL 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 EP 管，依次加入 **100μL 上清液**，700μL 试剂一，100μL 试剂四，100μL 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：

1. 按液体样品的体积计算

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

C 标准液：250μmol/L=0.25 m mol/L；

样品稀释倍数：（0.1mL 样品+0.9mL 试剂一）÷ 0.1 mL 样品=10； V 总： 1mL；

2. 按组织质量计算

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

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。

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 μ mol/L=0.25μ mol/mL；

Cpr：上清液蛋白质含量，mg/mL。

4. 按细胞数量计算

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

C 标准液：250 μ mol/L；

V 总：上清液总体积 1.0 mL=0.001 L。

注意事项：

- 样品处理等过程均需要在冰上进行。
- 试剂四需现配现用，配置好的一周内使用完。
- 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。
- 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。