

柠檬酸（citric acid, CA）含量测定试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 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：

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、1mL 玻璃比色皿和蒸馏水。

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，250μmol/L 柠檬酸标准液，4℃保存。

样品处理：

1. 液体样品：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：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：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 200μL，以及试剂三 2μL，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 EP 管，依次加入 100μL 蒸馏水，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 空白管。

4. 标准管：取 EP 管，依次加入 100 μ L 标准液，700 μ L 试剂一，100 μ L 试剂四，100 μ 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。

5. 测定管：取 EP 管，依次加入 100 μ L 上清液，700 μ L 试剂一，100 μ L 试剂四，100 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。

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：250 μ mol/L=0.25 mmol/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

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

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=0.25 μ 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：

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。