

柠檬酸 (CA) 含量检测试剂盒说明书

(货号: ADS-W-S019 微板法 96 样)

有效期; 3 个月

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:

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 60ml×2 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 液体 20ml×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂三: 液体 220 μl ×1 管, 4℃ 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 2ml×1 管, 4℃ 避光保存。

标准品: 液体 1ml×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 (10⁴ 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。

3. 测定:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30 min 以上, 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 以上。

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 μL 上清液, 140 μL 试剂一, 20 μL 试剂四, 20 μL 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。

柠檬酸含量计算：

1. 按液体样品的体积计算

柠檬酸含量 (nmol/mL)

$$= [C \text{ 标准液} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \times \text{样品稀释倍数} \times V \text{ 总}$$
$$= 2500 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})$$

C 标准液：250 μ 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

柠檬酸含量 (nmol/g 鲜重)

$$= [C \text{ 标准液} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \times V \text{ 总} \div W$$
$$= 250 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div W$$

C 标准液：250 μ mol/L=250 nmol/mL；V 总：上清液总体积，1.0 mL；W：样品质量，g。

3. 按蛋白含量计算

柠檬酸含量 (nmol/mg prot)

$$= [C \text{ 标准液} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \div Cpr$$
$$= 250 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div Cpr$$

C 标准液：250 μ mol/L=250 nmol/mL；Cpr：上清液蛋白质含量，mg/mL。

4. 按细胞数量计算

柠檬酸含量 (nmol/10⁴ 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 μ mol/L=250 nmol/mL；V 总：上清液总体积，1.0 mL。

注意事项：

1. 样品处理等过程均需要在冰上进行。
2. 试剂四和标准液需现配现用；
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。