

柠檬酸 (citric acid, CA) 含量测定试剂盒说明书

(货号: ADS-W-S002 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

柠檬酸广泛用于食品、医药与工业中。同时柠檬酸(CA)也是三羧酸循环第一步反应的产物, 参与呼吸代谢等生理代谢活动。

铁 (III) -磺基水杨酸生成紫红色络合物, 柠檬酸可使该络合物颜色褪至橙红。于 470nm 波长下, 其吸光度的减小与柠檬酸含量在一定条件下呈正比, 从而可求得样品中柠檬酸含量。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 120mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	粉剂 2 支	4℃保存	每支: 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 再分别加 1mL 蒸馏水溶解备用, 现配现用。
试剂二	粉剂 1 瓶	4℃避光保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部 (可手动甩一甩); 2. 加入 5mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000g, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例提取

② 液体样本: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

③ 细菌、真菌样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液; 冰浴超声波破碎细菌或细胞 (功率 300w, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3min); 12000g, 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 1000~5000: 1 的比例进行提取

2、检测步骤:

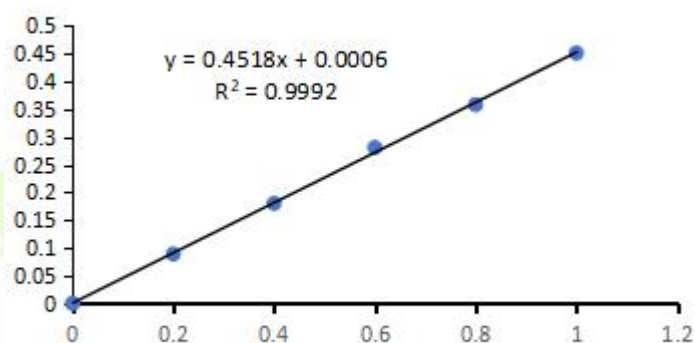
- ① 酶标仪预热 30 min（等仪器过自检程序亦可），调节波长到 470 nm。
- ② 在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
试剂一	10	10
试剂二	40	40
提取液	40	40
样本	10	
蒸馏水	100	110
混匀，室温（25℃）条件下孵育 20min，于 470nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{空白}} - A_{\text{测定}}$ 。		

- 【注】1. 若 A 测定管值在零附近或者 A 测定最后颜色接近无色，表明样本中柠檬酸含量较高，可对样本用蒸馏水稀释后再检测，则稀释倍数 D 需代入公式重新检测。
2. 若 A 测定管接近空白管或 ΔA 值在零附近，可增加样本加样体积 V1（如增至 50μL，则提取液或蒸馏水相应减少）。

五、结果计算：

1、标准曲线：y = 0.4518x + 0.0006；x 是标准品浓度（mg/mL），y 是 ΔA 。



2、按组织质量计算：

$$\begin{aligned} \text{柠檬酸含量(mg/g 鲜重)} &= [(\Delta A - 0.0006) \div 0.4518 \times V1] \div (W \times V1 \div V) \times D \\ &= 2.21 \times (\Delta A - 0.0006) \div W \times D \end{aligned}$$

3、按样本蛋白浓度计算：

$$\begin{aligned} \text{柠檬酸含量(mg/g prot)} &= [(\Delta A - 0.0006) \div 0.4518 \times V1] \div (V1 \times Cpr \div V) \times D \\ &= 2.21 \times (\Delta A - 0.0006) \div Cpr \times D \end{aligned}$$

4、按液体体积计算：

$$\text{柠檬酸含量(mg/mL)} = [(\Delta A - 0.0006) \div 0.4518 \times V1] \div V1 \times D = 2.21 \times (\Delta A - 0.0006) \times D$$

5、按细胞数量计算：

$$\begin{aligned} \text{柠檬酸含量(mg/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A - 0.0006) \div 0.4518 \times V1] \div (500 \times V1 \div V) \times D \\ &= 2.21 \times (\Delta A - 0.0006) \times D \div 500 \end{aligned}$$

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

W---样本质量，g；

500---细胞或细菌总数，万；

D---稀释倍数，未稀释即为 1。

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（1mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管的加样表操作，根据结果即可制作标准曲线。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 制备标准品母液（1mg/mL）：向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水（母液需在两天内用且-20℃保存）；
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

标品浓度 mg/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
标品母液 uL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。在 96 孔板中依次加入：

试剂组分（μL）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
试剂一	10	10
试剂二	40	40
提取液	40	40
样本	10	
蒸馏水	100	110
混匀，室温（25℃）条件下孵育 20min，于 470nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		