

柠檬酸(CA)含量检测试剂盒说明书

Citric Acid Assay Kit

分光光度法

货号: AK314

规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK314-A	100 mL×1 瓶	4℃保存;
AK314-B	10 mL×1 瓶	4℃保存;
AK314-C	0.1 mL×1 支	-20℃保存;
AK314-D	粉剂×1 瓶	室温保存。临用前配制, 加入 5mL AK314-A 充分溶解, 一周内使用完。
AK314-E	5 mL×1 瓶	4℃避光保存;
AK314-标准品	1ml×1 支	250μmol/L 柠檬酸标准液, 4℃保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 柠檬酸 (Citric Acid, CA) 是一种重要的有机酸, 又名枸橼酸, 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 是三羧酸循环反应系统中, 由草酰乙酸加入乙酰辅酶 a 的乙酰基而形成的产物。

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。

自备用品:

可见分光光度计、1ml 玻璃比色皿、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

样本的前处理:

1. 液体样品: 取 0.1mL 液体加 AK314-A 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): AK314-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK314-A) 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): AK314-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK314-A) 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 AK314-B 200μl, 以及 AK314-C 2μl, 充分悬浮溶解, 11000g, 4℃离心 10min, 取上清液, 待测。
4. 细胞: 按照细胞数量 (10^4 个): AK314-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL AK314-A), 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

1. 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 545 nm, 蒸馏水调零。
2. 将 AK314-A 置于 30℃水浴中预热 30min。
3. 在 EP 管或 1 mL 玻璃比色皿中加入下列试剂:

试剂名称	空白管 (μL)	标准管 (μL)	测定管 (μL)
蒸馏水	100		

标准液		100	
上清液			100
AK314-A	700	700	700
AK314-D	100	100	100
AK314-E	100	100	100
充分混匀后室温静置 30min, 于 545nm 测定吸光度, 记录为: A 空白管, A 标准管, A 测定管。			

注意：空白管和标准管只需测定 1-2 次。

柠檬酸(CA)计算公式：

1. 按液体样品的体积计算：

$$\begin{aligned}\text{柠檬酸含量 (mmol/L)} &= [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times \text{样品稀释倍数} \\ &= 2.5 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})\end{aligned}$$

注： C 标准液：250 $\mu\text{mol/L}$ = 0.25 mmol/L；样品稀释倍数：(0.1 mL 样品+0.9mL AK314-A) $\div$ 0.1 mL 样品=10

2. 按组织质量计算：

$$\begin{aligned}\text{柠檬酸含量 (\mu mol/g)} &= [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times \text{V 总} \div \text{W} \\ &= 0.25 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{W}\end{aligned}$$

注： C 标准液：250 $\mu\text{mol/L}$ ；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

$$\begin{aligned}\text{柠檬酸含量 (\mu mol/mg prot)} &= [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \div \text{Cpr} \\ &= 0.25 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

注： C 标准液：250 $\mu\text{mol/L}$ =0.25 $\mu\text{mol/mL}$ ；Cpr：上清液蛋白质含量，mg/mL。

4. 按细胞数量计算

$$\begin{aligned}\text{柠檬酸含量 (\mu mol/10}^4 \text{ cell)} &= [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times \text{V 总} \div \text{细胞数量} \\ &= 0.25 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div \text{细胞数量}\end{aligned}$$

C 标准液：250 $\mu\text{mol/L}$ ；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. AK314-D 需现配现用，配置好的一周内使用完；
3. AK314-E 为易致癌物质，实验过程中，需佩戴手套，避免溅到皮肤上；
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；
5. 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。