

柠檬酸（CA）含量检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC2155

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 120 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 22 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 0.25 mL×1 支	-20℃保存
试剂四	粉剂×2 支	常温保存
试剂五	液体 3 mL×1 瓶	2-8℃保存
标准品	液体 1 mL×1 支	2-8℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂三：为易挥发试剂，用完后尽快密封，-20℃保存；
- 2、试剂四：临用前取 1 支加入 1.5 mL 试剂一，充分溶解，用不完的试剂 2-8℃保存 2 周。
- 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、标准品：2 μmol/mL 柠檬酸标准液。

产品说明：

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。

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，即可计算出样本中柠檬酸含量。



技术指标：

最低检出限：0.04 μmol/mL

线性范围：0.05-5 μmol/mL

注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、微量玻璃比色皿/96孔板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）





- 1、液体样本中柠檬酸提取：取 0.1mL 液体加试剂一 0.9mL，充分混匀，11000g，4℃离心 10min，取上清液置于冰上待测。（若测定值较低，可适当调整液体样本和试剂一的体积比例，如（0.2mL 液体样本+0.8mL 试剂一）或（0.5mL 液体样本+0.5mL 试剂一）。）
- 2、组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（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、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；11000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 4、线粒体中柠檬酸提取：称约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一，冰上充分研磨，600g，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，取上清液置于冰上待测。

二、测定步骤

- 1、分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长到545nm，分光光度计蒸馏水调零。
- 2、试剂一置于30℃水浴中预热30min以上。
- 3、操作表（按下表在1.5mLEP管/96孔板管中加入相应试剂）：

试剂名称（μL）	空白管	测定管	标准管
蒸馏水	20	-	-
上清液	-	20	-
标准品	-	-	20
试剂一	140	140	140
试剂四	20	20	20
试剂五	20	20	20

充分混匀后室温静置30min，于545nm测定吸光度，记为A空白管、A测定管、A标准管，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}$ 。空白管和标准管只需测定1-2次。

三、柠檬酸含量计算

- 1、按液体体积计算：

$$\text{柠檬酸含量} (\mu\text{mol/mL}) = C_{\text{标准液}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F = 20 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$$

- 2、按组织质量计算：

$$\text{柠檬酸含量} (\mu\text{mol/g 质量}) = C_{\text{标准液}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{总}} \div W = 2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W$$

- 3、按细胞/细菌数量计算：

$$\text{柠檬酸含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = C_{\text{标准液}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{总}} \div N = 2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N$$

- 4、按蛋白浓度计算：

$$\text{柠檬酸含量} (\mu\text{mol/mg prot}) = C_{\text{标准液}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) = 2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

C标准液：标准品的浓度，2μmol/mL；F：样本稀释倍数，（0.1mL样本+0.9mL试剂一）÷0.1mL样本=10；V总：上清液总体积，1.0mL；W：样本质量，g；N：细胞/细菌数量，以万计；Cpr：上清液蛋白浓度，mg/mL，需自行测定；V样：加入的样本体积，20μL=0.02 mL。

注意事项：

- 1、样本处理等过程均需要在冰上进行。



- 2、柠檬酸试剂一不能用于蛋白含量测定，如需测定蛋白含量，需另取组织进行测定。
- 3、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。
- 4、如果样本吸光值大于0.5（96孔板）或1.0（比色皿），建议将样本用试剂一稀释后进行测定。

实验实例：

- 1、取 0.1065g 竹子叶片加入 1mL 试剂一，冰上充分研磨，11000g 4℃离心 10min，取上清液按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管=0.185-0.109=0.076， ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.292-0.109=0.183，按样本质量计算得：
柠檬酸含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) = $2 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W = 7.80 \mu\text{mol/g}$ 质量。
- 2、取 0.1094g 兔肾脏组织加入 1mL 试剂一，冰上充分研磨，11000g 4℃离心 10min，取上清液按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管=0.270-0.109=0.161， ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.292-0.109=0.183，按样本质量计算得：
柠檬酸含量 ($\mu\text{mol/g}$ 质量) = $2 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} \div W = 16.08 \mu\text{mol/g}$ 质量。
- 3、取 0.1mL 小鼠血清加试剂一 0.9mL，充分混匀，11000g 4℃离心 10min，取上清液按照测定步骤操作，使用 96 孔板测得计算 ΔA 测定=A 测定管-A 空白管=0.174-0.109=0.065， ΔA 标准=A 标准管-A 空白管=0.292-0.109=0.183，按液体样本的体积计算：
柠檬酸含量 ($\mu\text{mol/mL}$) = $20 \times \Delta A \text{ 测定} \div \Delta A \text{ 标准} = 7.10 \mu\text{mol/mL}$ 。

相关发表文献：

- [1] Huang X, Pan L, Zuo Z, Li M, Zeng L, Li R, Ye Y, Zhang J, Wu G, Bai R, Zhuang L, Wei L, Zheng Y, Su J, Deng J, Deng S, Zhang S, Zhu S, Che X, Wang C, Wu C, Chen R, Lin D, Zheng J. LINC00842 inactivates transcription co-regulator PGC-1 α to promote pancreatic cancer malignancy through metabolic remodelling. *Nat Commun.* 2021 Jun 22;12(1):3830. doi: 10.1038/s41467-021-23904-4. PMID: 34158490; PMCID: PMC8219694.
- [2] Shen Y, Wang J, Xia R, Tong M, Huang Y, Xu L, Zhu Z, Meng Q, Yu Y. Integrative Analysis of Transcriptomic and Proteomic Changes Related to Cytoplasmic Male Sterility in Spring Stem Mustard (*Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee). *Int J Mol Sci.* 2022 Jun 2;23(11):6248. doi: 10.3390/ijms23116248. PMID: 35682925; PMCID: PMC9180981.
- [3] Lu Y, Bi T, Zhou S, Guo M. MEX3A promotes angiogenesis in colorectal cancer via glycolysis. *Libyan J Med.* 2023 Dec;18(1):2202446. doi: 10.1080/19932820.2023.2202446. PMID: 37155144; PMCID: PMC10167874.
- [4] Chen P, Song Y, Liu X, Xiao L, Bu C, Liu P, Zhao L, Ingvarsson PK, Wu HX, El-Kassaby YA, Zhang D. LncRNA PMAT-PtoMYB46 module represses PtoMATE and PtoARF2 promoting Pb²⁺ uptake and plant growth in poplar. *J Hazard Mater.* 2022 Jul 5;433:128769. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.128769. Epub 2022 Mar 23. PMID: 35364535.
- [5] Zhang Z, Luo W, Chen G, Chen J, Lin S, Ren T, Lin Z, Zhao C, Wen H, Nie Q, Meng X, Zhang X. Chicken muscle antibody array reveals the regulations of LDHA on myoblast differentiation through energy metabolism. *Int J Biol Macromol.* 2024 Jan;254(Pt 1):127629. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.127629. Epub 2023 Oct 25. PMID: 37890747.

相关系列产品：

- BC0710/BC0715 α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性检测试剂盒
- BC0950/BC0955 琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性检测试剂盒
- BC0380/BC0385 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒

