



# 柠檬酸 (Citric Acid, CA) 试剂盒说明书(精简版)

(货号: A128-1-1 50T/48 样)

## 一、测定意义

柠檬酸 (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 是三羧酸循环第一步反应的产物。

## 二、测定原理

酸性条件下, 柠檬酸还原  $Cr^{6+}$  生成  $Cr^{3+}$ ,  $Cr^{3+}$  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。

## 三、自备实验用品及仪器。

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

## 四、试剂组成和配制

试剂一: 液体×1 瓶, 4°C 保存;  
试剂二: 液体×1 瓶, 4°C 保存;  
试剂三: 液体×1 支, -20°C 保存;  
试剂四: 粉剂×1 瓶, 室温保存; 临用前加入 5ml 试剂一, 充分溶解配置;  
试剂五: 液体×1 瓶, 4°C 避光保存;  
标准品: 液体×1 支, 250 $\mu$ mol/L 柠檬酸标准液, 4°C 保存。

## 五、样品中柠檬酸提取

- 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°C 离心 10min, 取上清液待测;
- 组织中柠檬酸提取: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (ml) 为 1:5 至 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°C 离心 10min, 取上清液置冰上待测;
- 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 至 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, 4°C 离心 5min; 取上清至另一 EP 管中, 11000g, 4°C 离心 10min, 弃上清; 向沉淀中加 200 $\mu$ L 试剂二, 与 2 $\mu$ L 试剂三, 充分悬浮溶解, 11000g; 4°C 离心 10min, 取上清液待测。
- 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 万细胞加入试剂一 1ml), 冰水浴超声破碎细胞 (功率 300W, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 3 分钟), 11000g; 4°C 离心 10min, 取上清液待测。

## 六、测定操作表

	空白管	标准管	测定管
蒸馏水 ( $\mu$ L)	100		
标准液 ( $\mu$ L)		100	
上清液 ( $\mu$ L)			100
试剂一 ( $\mu$ L)	700	700	700
试剂四 ( $\mu$ L)	100	100	100
试剂五 ( $\mu$ L)	100	100	100
混匀, 室温静置 30min, 1ml 玻璃比色皿, 545nm, 蒸馏水调零, 测定各管 $A_{545}$ 。			

注: 试剂一需在 30°C 水浴中预热 30min 以上方能用于检测。

## 七、柠檬酸计算公式

1. 按液体样品的体积计算

$$\text{柠檬酸含量} (\mu\text{mol/L}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{总}} \times \text{样本稀释倍数} = 2.5 \times \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}}$$

2. 按组织质量计算

$$\text{柠檬酸含量} (\mu\text{mol/g 组织}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{总}} \div W = 0.25 \times \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \div W$$

3. 按线粒体蛋白含量计算

$$\text{柠檬酸含量} (\mu\text{mol/mgprot}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}} = 0.25 \times \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \div C_{\text{pr}}$$

4. 按照细胞数来计算

$$\text{柠檬酸含量} (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \times V_{\text{总}} \div \text{细胞数} = 0.25 \times \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \div \text{细胞数}$$

## 八、注意事项

- 样品处理等过程均需在冰上进行;
- 试剂四需现配现用;
- 试剂五中含有致癌物质, 实验过程中, 请佩戴手套, 避免试剂五溅到皮肤上;
- 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, 使用本研究所蛋白质含量检测试剂盒 (考马或 BCA 法)。