



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

柠檬酸(CA)含量检测试剂盒(微量法)

货号: R41958

规格: 100T/96S

有效期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
试剂-A	100 mL×2瓶	2-8℃保存;
试剂-B	20 mL×1瓶	2-8℃保存;
试剂-C	0.25 mL×1支	-20℃保存;
试剂-D	粉剂×1瓶	室温保存。临用前配制, 加入2mL试剂-A充分溶解, 一周内使用完。
试剂-E	2 mL×1瓶	2-8℃避光保存;
标准品	1ml×1支	250μmol/L柠檬酸标准液, 2-8℃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/酶标仪、微量玻璃比色皿/96 孔板、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 试剂-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): 试剂-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂-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): 试剂-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂-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); 向沉淀中加试剂-B 200μl, 以及 试剂-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): 试剂-A 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL 试剂-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/酶标仪预热 30 min, 调节波长到 545 nm, 蒸馏水调零。
2. 将 试剂-A 置于 30℃水浴中预热 30min。
3. 在 EP 管或 96 孔板中加入下列试剂:

试剂名称	空白管(μL)	标准管(μL)	测定管(μL)
蒸馏水	20		
标准液		20	
上清液			20
试剂-A	140	140	140
试剂-D	20	20	20
试剂-E	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标准 管, A测定管。			

注意: 空白管和标准管只需测定一次。

柠檬酸(CA)计算公式:



1. 按液体样品的体积计算:

柠檬酸含量 (mmol/L) = [C 标准液×(A 测定管-A 空白管)÷(A 标准管-A 空白管)]×样品稀释倍数 = 2.5×(A 测定管-A 空白管)÷(A 标准管-A 空白管)

注: C 标准液: 250 μmol/L = 0.25 mmol/L; 样品稀释倍数: (0.1 mL 样品 + 0.9 mL 试剂-A)÷0.1 mL 样品 = 10

2. 按组织质量计算:

柠檬酸含量 (μmol/g) = [C 标准液×(A 测定管-A 空白管)÷(A 标准管-A 空白管)]×V 总÷W = 0.25×(A 测定管-A 空白管)÷(A 标准管-A 空白管)÷W

注: C 标准液: 250 μmol/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:

柠檬酸含量 (μmol/mg prot) = [C 标准液×(A 测定管-A 空白管)÷(A 标准管-A 空白管)]÷Cpr = 0.25×(A 测定管-A 空白管)÷(A 标准管-A 空白管)÷Cpr

注: C 标准液: 250 μmol/L = 0.25 μmol/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 (μmol/10⁴ cell) = [C 标准液×(A 测定管-A 空白管)÷(A 标准管-A 空白管)]×V 总÷细胞数量 = 0.25×(A 测定管-A 空白管)÷(A 标准管-A 空白管)÷细胞数量

注: C 标准液: 250 μmol/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. 试剂-D 需现配现用, 配置好的一周内使用完;
3. 试剂-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。