

使用说明书

Instruction Manual

TargetMol
YOUR TARGET MOLECULES

柠檬酸(CA)含量检测试剂盒（分光光度法）

Citric Acid Assay Kit (Spectrophotometry)

产品描述

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。

检测原理

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。

产品组成及储存条件

50T/48S 规格的产品组成如下:

组成	规格	储存条件
CB0054S-A	100mL×1 瓶	4°C 保存。
CB0054S-B	10mL×1 瓶	4°C 保存。
CB0054S-C	0.1mL×支	-20°C 保存。
CB0054S-D	粉剂×1 瓶	室温保存。临用前配制, 加入 5mL CB0054S-A 充分溶解, 一周内用完。
CB0054S-E	5mL×1 瓶	4°C 避光保存。
CB0054S-Standard	1mL×1 支	250μmol/L 柠檬酸标准液, 4°C 保存。

注: 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、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。

二、样本的前处理:

- 液体样品: 取 0.1mL 液体加 CB0054S-A 0.9mL, 充分混匀, 11000g, 4°C 离心 10min, 取上清液, 待测。
- 组织: 按照组织质量 (g): CB0054S-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL CB0054S-A) 进行冰浴匀浆。11000g, 4°C 离心 10min, 取上清置冰上待测。
- 线粒体: 按照组织质量 (g): CB0054S-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL CB0054S-A) 进行冰浴匀浆, 600g/min, 4°C 离心 5min; 取上清至另一 EP 管中, 11000g, 4°C 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 CB0054S-B 200μl, 以及 CB0054S-C 2μl, 充分悬浮溶解, 11000g, 4°C 离心 10min, 取上清液, 待测。
- 细胞: 按照细胞数量 (10^4 个): CB0054S-A 体积 (mL) 为 500~1000:1 的比例 (建议 500 万细胞加入 1mL CB0054S-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°C 离心 10min, 取上清置冰上待测。

三、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 CB0054S-A 置于 30°C 水浴中预热 30min。
3. 在 EP 管或 1mL 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
CB0054S-A	700	700	700
CB0054S-D	100	100	100
CB0054S-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: 空白管和标准管只需测定 1-2 次。

四、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 μmol/L = 0.25 mmol/L; 样品稀释倍数: (0.1 mL 样品 + 0.9 mL CB0054S-A) ÷ 0.1 mL 样品 = 10。

2. 按组织质量计算:

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

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

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

注: C 标准液: 250 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

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

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. CB0054S-D 需现配现用, 配置好的一周内使用完。
3. CB0054S-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。
6. 本产品仅限于专业人员的科学研究用, 不得用于临床诊断或治疗, 不得用于食品或药品, 不得存放于普通住宅内。
7. 为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

