



柠檬酸 (CA) 含量检测试剂盒  
Citric Acid (CA) Content Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司  
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



## 柠檬酸 (CA) 含量检测试剂盒

### Citric Acid (CA) Content Assay Kit

#### 一、产品描述

柠檬酸 (CA) 作为三羧酸循环第一步反应产物可参与光合作用、呼吸作用以及氨基酸、芳香物质、酯类和酚类物质的合成过程, 其含量对于分析代谢过程具有重要意义, 柠檬酸及其盐独特的分子结构使其具有各种优良的性质, 可作为风味剂、稳定剂、抗氧化剂、抗凝血剂、缓蚀剂等, 在食品加工、化妆品、畜牧业和医药领域具有广泛应用。

柠檬酸能够在酸性条件下将  $\text{Cr}^{6+}$  还原为  $\text{Cr}^{3+}$ , 并生成柠檬酸铬螯合物, 产物在 545 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化即可定量检测柠檬酸的含量。

#### 二、产品内容

| 名称  | 试剂规格                      | 储存条件      | 使用方法及注意事项                            |
|---|---------------------------|-----------|--------------------------------------|
| 试剂一   | 液体 130 mL×1 瓶             | 4°C保存     | -                                    |
| 试剂二   | 液体 22 mL×1 瓶              | 4°C保存     | -                                    |
| 试剂三   | 液体 220 $\mu\text{L}$ ×1 支 | -20°C避光保存 | -                                    |
| 试剂四   | 粉剂×1 支                    | RT 避光保存   | 使用前加入 3 mL 试剂一充分溶解<br>(配制后 4°C可保存一周) |
| 试剂五   | 液体 3 mL×1 瓶               | 4°C避光保存   | -                                    |
| 标准液   | 液体 1 mL×1 支               | 4°C保存     | 10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 柠檬酸标准液  |
| 标准稀释液的制备: 将 10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 柠檬酸标准液使用蒸馏水稀释至 4.0、3.0、2.0、1.0、0.5、0.25 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 即为标准稀释液。 |                           |           |                                      |

| 序号                                  | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6    |
|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 稀释前浓度 ( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ) | 10  | 10  | 10  | 2.0 | 1.0 | 0.5  |
| 标准液体积 ( $\mu\text{L}$ )             | 200 | 150 | 100 | 200 | 200 | 200  |
| 蒸馏水体积 ( $\mu\text{L}$ )             | 300 | 350 | 400 | 200 | 200 | 200  |
| 稀释后浓度 ( $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ) | 4.0 | 3.0 | 2.0 | 1.0 | 0.5 | 0.25 |

#### 三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿 (光径 10 mm) /96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

## 1. 柠檬酸的提取（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①液体样本：吸取 0.1 mL 液体样本加入 0.9 mL 试剂一充分混匀，4°C 11000 g 离心 10 min，取上清液置于冰上待测。

②组织样本：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 试剂一）处理样品，冰浴匀浆，4°C 11000 g 离心 10 min，取上清液置于冰上待测。

③线粒体中柠檬酸的提取：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：（5-10）的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 试剂一）处理样品，冰浴匀浆，4°C 600 g 离心 5 min；取上清至新的离心管中，4°C 11000 g 离心 10 min，弃上清（此上清液可用于细胞质 CA 含量测定）；向沉淀中加入 200  $\mu$ L 试剂二和 2  $\mu$ L 试剂三，充分悬浮溶解，4°C 11000 g 离心 10 min，取上清液置于冰上待测。

④细菌、真菌中柠檬酸的提取：离心收集细菌或细胞到离心管内，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 1 mL 试剂一）处理样品，冰浴超声破碎细菌或细胞（功率 300 W，超声 3 s，间隔 7 s，总时间 3 min），4°C 11000 g 离心 10 min，取上清液置于冰上待测。

## 2. 测定步骤

①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 545 nm，蒸馏水调零。

②试验前将试剂一 30°C 预热 30 min 以上。

③在 96 孔板或离心管中依次加入下列试剂：

| 试剂               | 测定组<br>( $\mu$ L) | 标准组<br>( $\mu$ L) | 空白组<br>( $\mu$ L) |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 待测样本             | 20                | -                 | -                 |
| 标准稀释液            | -                 | 20                | -                 |
| 蒸馏水              | -                 | -                 | 20                |
| 试剂一              | 140               | 140               | 140               |
| 试剂四              | 20                | 20                | 20                |
| 试剂五              | 20                | 20                | 20                |
| 充分混匀，室温显色 30 min |                   |                   |                   |

**吸光值测定：**测定 545 nm 处吸光值，记为 A 测定、A 标准和 A 空白；计算  $\Delta A$  测定 = A 测定 - A 空白， $\Delta A$  标准 = A 标准 - A 空白。注：空白组只需测定 1-2 次。

**标准曲线的建立：**以 4.0、3.0、2.0、1.0、0.5、0.25  $\mu$ mol/mL 为横坐标（x），以其对应的  $\Delta A$  标准为纵坐标（y），绘制标准曲线，得到标准方程  $y=kx+b$ ，将  $\Delta A$  测定带入公式中得到 x（ $\mu$ mol/mL）。

### 3.柠檬酸（CA）含量计算

#### ①按组织样本质量计算

$$\text{柠檬酸含量 } (\mu\text{mol/g}) = \frac{x \times V_{\text{样总}}}{W} = \frac{x}{W}$$

#### ②按液体样本体积计算

$$\text{柠檬酸含量 } (\mu\text{mol/mL}) = \frac{x \times V_{\text{样总}}}{V_{\text{液}}} = 10 \times x$$

#### ③按线粒体蛋白含量计算

$$\text{柠檬酸含量 } (\mu\text{mol/mg prot}) = \frac{x}{C_{\text{pr}}}$$

#### ④按细菌或细胞数量计算

$$\text{柠檬酸含量 } (\mu\text{mol}/10^4 \text{ cell}) = \frac{x \times V_{\text{样总}}}{\text{细菌或细胞数量}} = \frac{x}{\text{细菌或细胞数量}}$$

**注释：** V 样总：待测样本总体积，1 mL；V 液：提取过程中加入液体样本的体积，0.1 mL；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；细菌或细胞数量：以万计。

### 四、注意事项

- ①待测样本需置于冰上放置，且柠檬酸提取过程需在冰上进行；
- ②若测定吸光值超出标准线性吸光值范围：高于最高值建议将待测样本适当稀释后再进行测定；低于最低值建议适当增加样本量重新提取后再进行测定，计算时相应修改；
- ③试剂五为易致癌物质，实验过程中需佩戴手套并做好防护，避免皮肤接触；
- 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，应另取组织进行测定；
- ⑤若显色 30 min 后出现明显黑色颗粒，属于正常现象，需将待测样本适当稀释后重新进行测定；
- ⑥为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

**For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.**

**boxbio**

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.  
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

