

柠檬酸（CA）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1108

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/48S 96T/96S

检测范围：0.125mM-8mM(标准品的检测范围) 灵敏度：0.125mM(标准品的检测范围)

适用样本：组织、细胞、细菌、真菌、果汁等液体样本

产品简介

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。本试剂盒提供了一种简单易用的方法，用于测量各种生物样本中 CA 含量。原理是酸性条件下，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。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	60mL	120mL	4℃ 保存
试剂二	10mL	20mL	4℃ 保存
试剂三	120 μL	240 μL	-20℃避光保存
试剂四	粉剂×1 支	粉剂×1 支	室温保存
试剂五	1.25mL	2.5mL	4℃，避光保存
柠檬酸标准品（40mM）	1mL	1mL	4℃

自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计（能测 545nm 处的吸光度）

水浴锅、制冰机、低温离心机

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

去离子水

匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

注意：小管试剂开盖前，请先低速离心。

试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；-20℃ 保存。

试剂四：临用前配制，48T 加入 1.25mL 试剂一，96T 加入 2.5mL 试剂一，充分溶解。用不完的试剂 4℃ 保存 2 周。

试剂五：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 避光保存。

工作液：每孔准备 180 μL 工作液，现配现用：吸取 140 μL 试剂一，20 μL 试剂四，20 μL 试剂五混合均匀。

柠檬酸标准品（8mM）：取 40mM 柠檬酸标准品用去离子水 1:5 稀释，建议取 100 μL 40mM 柠檬酸标准品，加 400 μL 去离子水稀释至 8mM，混合均匀。

标准曲线设置：按下表所示，用提取液将 8mM 标准品稀释为 8、4、2、1、0.5、0.25、0.125mM 的标准溶液。

	标准品体积 (μL)	去离子水体积 (μL)	标准品浓度 (mM)

产品说明书

Std. 1	200μL 8mM	0	8
Std. 2	100μL of Std. 1	100	4
Std. 3	100μL of Std. 2	100	2
Std. 4	100μL of Std. 3	100	1
Std. 5	100μL of Std. 4	100	0.5
Std. 6	100μL of Std. 5	100	0.25
Std. 7	100μL of Std. 6	100	0.125

样本制备

液体样本中柠檬酸提取：取 0.1mL 液体，加入 1mL 试剂一。11000g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

组织中柠檬酸提取：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一，冰浴匀浆。11000g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

细胞、细菌、真菌中柠檬酸提取：取 500 万细胞、细菌、真菌加入 1mL 试剂一，冰浴超声波破碎 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），11000g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

组织线粒体中柠檬酸提取：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一，冰浴匀浆，600g，4℃离心 5min；舍弃沉淀，取上清至另一 EP 管中，11000g，4℃离心 10min，舍弃上清（此上清液可用于细胞质 CA 含量测定）；向沉淀中加试剂二 200 μl，以及试剂三 2 μl，充分悬浮溶解，11000g，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

注意：建议使用新鲜样本。如果不立即使用，可将样品在-80℃下保存 6 个月。制备的样本不能用于蛋白含量测定。

实验步骤

1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 545nm，可见光分光光度计去离子水调零。
2. 试剂一置于 30℃水浴中预热 30min。
3. 操作表（下述操作在 96 孔板或微量玻璃比色皿中操作）：

试剂（μL）	空白孔	标准孔	测定孔
样本	0	0	20
标准品	0	20	0
去离子水	20	0	0
工作液	180	180	180

充分混匀后室温静置 30min，测定 545nm 处吸光度，空白孔记为 $A_{空}$ ，标准孔记为 $A_{标}$ ，测定孔记为 $A_{测}$ 。计算 $\Delta A_{测} = A_{测} - A_{空}$ ， $\Delta A_{标} = A_{标} - A_{空}$ （空白和标准曲线只需做 1 次）。

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。如果 $\Delta A_{测}$ 小于 0.005 可适当加大样本量。如果反应 30min 后有明显黑色小颗粒，样本可用试剂一进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。

结果计算

1. 标准曲线的绘制

以标准溶液浓度为 y 轴， $\Delta A_{标}$ 为 x 轴，绘制标准曲线（浓度为 y 轴更方便计算结果）。

2. 柠檬酸含量的计算

将样本的 $\Delta A_{测}$ 代入方程得到 y 值（1mM=1 μmol/mL）。

（1）按样本鲜重计算

柠檬酸含量（μmol/g 鲜重）= $y \times V_{样} \div (W \times V_{样} \div V_{提取}) \times n = y \div W \times n$

（2）按样本体积计算

柠檬酸含量（μmol/mL）= $y \times V_{样} \div (V_{液} \times V_{样} \div V_{提取}) \times n = 10 \times y \times n$

（3）按细胞数目计算

产品说明书

柠檬酸含量 ($\mu\text{mol}/10^4 \text{ cells}$) $=y \times V_{\text{样}} \div (\text{细胞数量} \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \times n = y \div 500 \times n = 0.002 \times y \times n$

(4) 组织线粒体中柠檬酸含量的计算

线粒体柠檬酸含量 ($\mu\text{mol}/\text{g}$ 鲜重) $=y \times V_{\text{样}} \div (W \div V_{\text{重悬}} \times V_{\text{样}}) \times n = 0.202 \times y \div W \times n$

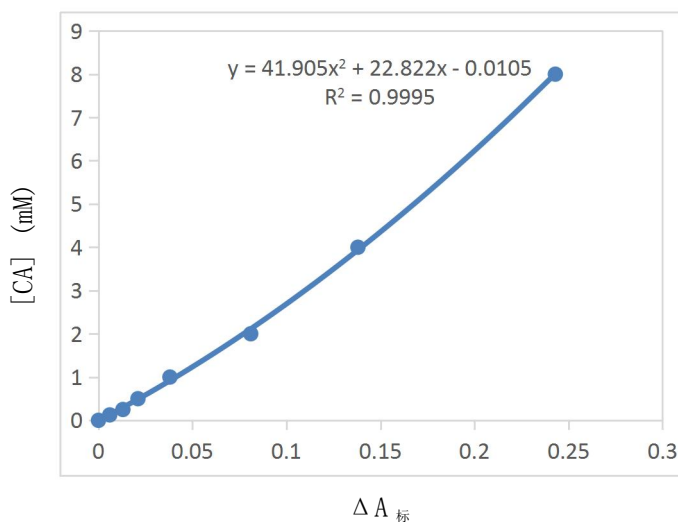
(5) 组织细胞质柠檬酸含量计算

细胞质柠檬酸含量 ($\mu\text{mol}/\text{g}$ 鲜重) $=y \times V_{\text{样}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) = y \div W \times n$

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02mL; W : 样本质量, g; $V_{\text{提取}}$: 加入提取液体积, 1mL; n : 样本稀释倍数; $V_{\text{液}}$: 制备时液体样本体积, 0.1mL; 500: 细胞数量, 500 万; $V_{\text{重悬}}$: 重悬线粒体沉淀体积, 0.202mL。

结果展示

典型标准曲线



注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1001 柠檬酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1116 丙酮酸 (PA) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1110 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1115 柠檬酸 (LA) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1001 柠檬酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

