柠檬酸（CA）含量检测试剂盒说明书

规格：48 样　　方法：酶标仪法

一、注意事项

1. 使用前请通读一遍说明书再开始实验。

2. 正式检测前选取 2~3 个样本进行预检测。

3. 本试剂盒仅用于科研。

二、产品组分

试剂名称	试剂规格	保存条件	备注
试剂一	60 mL×1	4℃	
试剂二	11 mL×1	4℃	
试剂三	0.15 mL×1	-20℃	
试剂四	粉剂×1	4℃	临用前加入 1.5 mL 试剂一，充分溶解。
试剂五	1.5 mL×1	4℃避光	
标准品	0.5 mL×1	4℃	250 μmol/L 柠檬酸标准液

三、仪器和用品

酶标仪、96 孔板、移液器、天平、可降温离心机、超纯水/蒸馏水、研磨仪/研钵、冰、水浴锅。

四、样品制备

1. 组织：按照组织质量（g）：试剂一体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1 g 组织，加入 1 mL 试剂一）进行冰浴匀浆，然后，11000 g，4℃，离心 10 min，置于冰上，上清为待测样本。

2. 细菌/细胞：按照细菌/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 1 mL 试剂一），冰浴超声波破碎细胞（功率 200 w，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次）；然后 11000g，4℃，离心 10 min，置于冰上，上清为待测样本。

3. 液体样本：取 0.1 mL 液体加试剂一 0.9 mL，充分混匀，11000g，4℃离心 10 min，取上清液，待测。

3. 线粒体中柠檬酸提取：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1 g 组织，加入 1 mL 试剂一）进行冰浴匀浆，600 g/min，

4℃离心 5 min；取上清至另一 EP 管中，11000 g，4℃离心 10 min，弃上清（此上清液可用于细胞质 CA 含量测定）；向沉淀中加试剂二 200 μL，以及试剂三 2μL，充分悬浮溶解，11000 g，4℃离心 10 min，取上清液，待测。

五、测定步骤

1. 酶标仪预热 30 min 以上，波长调至 545 nm 处。

2. 试剂一置于 30℃水浴中预热 30min。

3. 在 96 孔板中依次加入：

	测定管	标准管	空白管
样本（μL）	20	-	-
标准液（μL）	-	20	-
蒸馏水/超纯水（μL）	-	-	20
试剂一（μL）	140	140	140
试剂四（μL）	20	20	20
试剂五（μL）	20	20	20
混匀后室温静置 30min，于 545 nm 测定吸光度，记为 A 测定、A 标准、A 空白。ΔA 测定=A 测定-A 空白，ΔA 标准=A 标准-A 空白。			

六、计算

1. 按照样本质量计算：

柠檬酸含量（nmol/g 鲜重）=（C 标准液×ΔA 测定÷ΔA 标准）×V 总÷W = 250×ΔA 测定÷ΔA 标准 ÷W

2. 按照蛋白质浓度计算（需另测蛋白浓度）：

柠檬酸含量（nmol/mg prot）=（C 标准液×ΔA 测定÷ΔA 标准）÷Cpr = 250×ΔA 测定÷ΔA 标准÷Cpr

3. 按细菌/细胞数量计算：

柠檬酸含量（nmol/10^4 cell）=（C 标准液×ΔA 测定÷ΔA 标准）×V 总÷N = 250×ΔA 测定÷ΔA 标准÷N

4.按液体样品的体积计算

柠檬酸含量（nmol/mL）=（C 标准液×ΔA 测定÷ΔA 标准）×F×V 总 = 2500×ΔA 测定÷ΔA 标准

C 标准液：250 μmol/L=250 nmol/mL；V 总：上清液总体积，1 mL=0.001 L；W：样品质量，g；Cpr：上清液蛋白质含量，mg/mL；N：细胞数量，万个；F：液体样本稀释倍数：10。

七、产品简介

柠檬酸含量检测可用于衡量样品有机酸水平，判定风味、成熟度与新鲜度。用于品质质控、发酵工艺优化及抗逆生理研究。