

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：GBQ164

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(535-555 nm)

Elabscience®柠檬酸(CA)比色法测试盒

Citric Acid (CA) Colorimetric Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织样本、血清(浆)及线粒体中的柠檬酸含量。

检测原理

在酸性条件下，六价铬 Cr(VI)还原成 Cr³⁺，后者与柠檬酸发生络合反应，产物在 545 nm 处有特征吸收峰，通过测定 545 nm 吸光值的增加，即可计算出样品中柠檬酸的含量。

柠檬酸提取液不能用于蛋白含量测定，但线粒体的上清液可以直接测定蛋白浓度，推荐使用本公司的 BCA 试剂盒进行测定(货号：GBQ162)。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extracting Solution)	60 mL × 1 瓶	60 mL × 2 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	裂解液 (Lysis Buffer)	10 mL × 1 瓶	20 mL × 1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	还原试剂 (Reducing Agent)	粉剂 × 1 瓶	粉剂 × 1 瓶	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	显色剂 (Chromogenic Agent)	1.5 mL × 1 支	1.5 mL × 2 支	2-8℃避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	2 mmol/L 柠檬酸标准品 (2 mmol/L CA Standard)	2 mL × 1 瓶	2 mL × 1 瓶	2-8℃ 保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求
	96 孔覆膜	2 张		
	样本位置标记表	1 张		

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。
对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(535-555 nm，最佳检测波长 545 nm)

试剂准备

- ① 检测前，试剂平衡至室温。
- ② 试剂一如有析出，使用前80℃加热，直到透明液体，冷却后方可使用。
- ③ 试剂三工作液的配制：
向试剂三中加入5 mL试剂一，充分混匀溶解即可，2-8℃避光可保存7天。
- ④ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度(mmol/L)	0	0.2	0.5	0.8	1.0	1.2	1.5	2.0
2.0 mmol/L 标准品(μL)	0	20	50	80	100	120	150	200
双蒸水(μL)	200	180	150	120	100	80	50	0

样本准备

① 样本处理

血清血浆样本：直接检测；

组织中柠檬酸的提取：取 0.1 g 新鲜组织样本，加 0.9 mL 试剂一，冰上充分研磨， $11000 \times g$ ， 4°C 离心 10 min，取上清液待测；

线粒体中柠檬酸的提取：取 0.1 g 新鲜组织样本，加 0.9 mL 试剂一，冰上充分研磨， $600 \times g$ ， 4°C 离心 5 min，取上清液至另一 EP 管中，再 $10000 \times g$ ， 4°C 离心 10 min，弃上清（此上清液可用于细胞质 CA 的测定），向沉淀中加入 200 μL 试剂二，涡旋混匀仪使其充分悬浮， $10000 \times g$ ， 4°C 离心 10 min，取上清液待测。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：0.06-2.0 mmol/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	3-15	10%大鼠脑组织	5-10
狗血清	3-10	10%大鼠肝组织	5-20
大鼠血清	3-15	10%小鼠肾组织	5-10
马血清	3-10	10%大鼠肺组织	15-30
小鼠血浆	3-10	10%小鼠心组织	5-20

注：样本稀释液为试剂一。

实验关键点

试剂一取用时应倒出部分，再取用，避免试剂污染。

操作步骤

- ① 测定管：取 30 μ L 待测样本加入到 1.5 mL EP 管中；
标准管：取 30 μ L 不同浓度标准品加入到 1.5 mL EP 管中；
- ② 向上述步骤①中的测定管、标准管加入 210 μ L 的试剂一；
- ③ 向上述步骤②中的测定管、标准管加入 30 μ L 的试剂三工作液；
- ④ 向上述步骤③中的测定管、标准管加入 30 μ L 的试剂四；
- ⑤ 混匀，室温静置 30 min，取 200 μ L 上清于酶标板中，酶标仪 545 nm 处测定各孔 OD 值。

操作表

	标准管	测定管
样本(μ L)	--	30
不同浓度标准品(μ L)	30	--
试剂一(μ L)	210	210
试剂三工作液(μ L)	30	30
试剂四(μ L)	30	30
混匀，室温静置 30 min，取 200 μ L 上清于酶标板中，酶标仪 545 nm 处测定各孔 OD 值。		

本试剂盒检测线粒体样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 GBQ162)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

按血清(浆)样本的体积计算:

$$\begin{array}{l} \text{柠檬酸含量} \\ (\text{mmol/L}) \end{array} = (\Delta A - b) \div a \times f$$

按组织鲜重计算:

$$\begin{array}{l} \text{柠檬酸含量} \\ (\mu\text{mol/g wet weight}) \end{array} = (\Delta A - b) \div a \times f \div \frac{m}{V}$$

按线粒体蛋白含量计算:

$$\begin{array}{l} \text{柠檬酸含量} \\ (\text{mmol/gprot}) \end{array} = (\Delta A - b) \div a \div C_{\text{pr}} \times f$$

注解:

y: 标准品 OD 值-空白 OD 值(标准品浓度为 0 的 OD 值)

x: 吸光度对应的浓度

a: 标准曲线斜率

b: 标准曲线截距

ΔA : 样本测定 OD 值-空白 OD 值

f: 加入检测体系前样本的稀释倍数

m: 称取组织样品质量(0.1 g)

V: 提取液体积(0.9 mL)

C_{pr} : 上清液的蛋白浓度(gprot/L)

附录1 关键数据

1. 技术参数

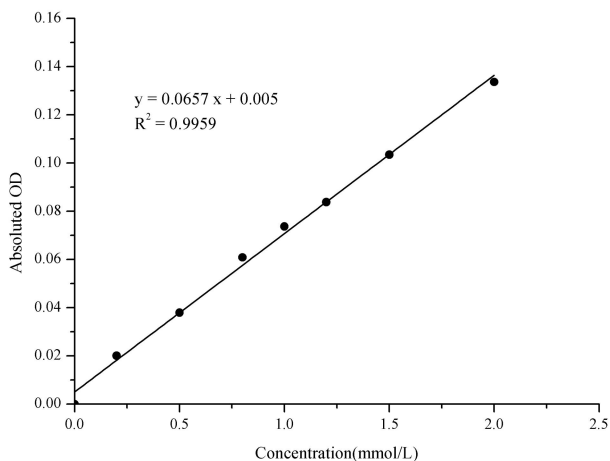
检测范围	0.06-2.0 mmol/L	平均批间差	4.0 %
灵敏度	0.06 mmol/L	平均批内差	4.0 %
平均回收率	95 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量30 μ L，按照操作步骤进行实验，读取各点OD值如下表所示：

标准品浓度 (mmol/L)	0.0	0.2	0.5	0.8	1.0	1.2	1.5	2.0
OD 值	0.071	0.091	0.112	0.136	0.147	0.154	0.177	0.204
	0.071	0.091	0.106	0.127	0.142	0.156	0.172	0.205
平均 OD 值	0.071	0.091	0.109	0.132	0.145	0.155	0.174	0.205
绝对 OD 值	0.000	0.020	0.038	0.061	0.074	0.084	0.103	0.134

②制标准曲线，如下图所示：



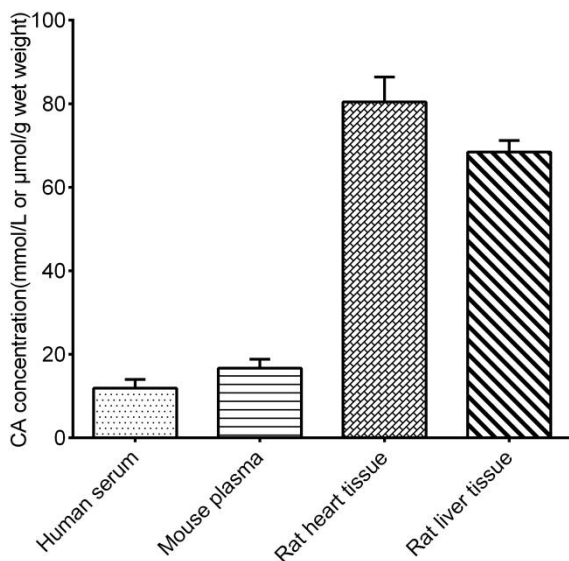
附录2 实例分析

例如检测人血清(数据仅供参考):

用试剂一将人血清稀释10倍,取30 μL 加入到1.5 mL EP管中,按操作表检测,结果如下:柠檬酸标准曲线: $y = 0.0672x + 0.0009$, 空白孔OD值为0.071, 测定孔OD值为0.142, 计算结果为:

$$\text{柠檬酸含量} = (0.142 - 0.071 - 0.0009) \div 0.0672 \times 10 = 10.432 \text{ mmol/L} \\ (\text{mmol/L})$$

按照说明书,测定人血清(稀释10倍,加样量30 μL)、小鼠血浆(稀释10倍,加样量30 μL)、10%大鼠心组织(稀释20倍,加样量30 μL)和10%大鼠肝组织匀浆(稀释20倍,加样量30 μL)中的柠檬酸含量(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
反应体系中出现浑浊	样本浓度太大	选择合适稀释倍数, 重新测定
	样本保存不当或保存时间过长	取新鲜样本, 重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用, 如将其用于临床诊断或任何其他用途, 我公司将不对因此产生的问题负责, 亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器, 严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低, 请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中, 建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责, 不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责, 使用前请充分考虑样本可能的使用量, 预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Tseng S.Ja. An acid degradable, lactate oxidizing nanoparticle formulation for non-small cell lung cancer virotherapy[J]. Nano Today. IF:18.962
2. Salman T M, Iyanda M A, Alli-Oluwafuyi A M, et al. Telfairia occidentalis stimulates hepatic glycolysis and pyruvate production via insulin-dependent and insulin-independent mechanisms[J]. Metabolism Open, 2021, 10(1-10):100092. IF:8.694
3. Wang H, Huang Q, Zhang Z, et al. Transient post-operative overexpression of CXCR2 on monocytes of traumatic brain injury patients drives monocyte chemotaxis toward cerebrospinal fluid and enhances monocyte-mediated immunogenic cell death of neurons in vitro[J]. Journal of Neuroinflammation, 2022. IF:7.573
4. Carafa V, Russo R, Della Torre L, et al. The Pan-Sirtuin Inhibitor MC2494 Regulates Mitochondrial Function in a Leukemia Cell Line[J]. Frontiers in Oncology, 2020, 10: 820. IF:4.848
5. Sun J, Leng P, Li X, et al. Salvianolic acid A promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes through regulation of the AMPK-PGC1 α signalling pathway. Adipocyte. 2022;11 (1):562-571. IF:3.553
6. Xu X, Cui Y, Li C, et al. SETD3 Downregulation Mediates PTEN Upregulation-Induced Ischemic Neuronal Death Through Suppression of Actin Polymerization and Mitochondrial Function. Mol Neurobiol. 2021; 58 (10):4906-4920. IF:3.464
7. Gao S, Li N, Chen R, et al. Bushen Huoxue Formula Modulates Autophagic Flux and Inhibits Apoptosis to Protect Nucleus Pulposus Cells by Restoring the AMPK/SIRT1 Pathway. Biomed Res Int. 2022; 2022:8929448. IF:3.047
8. Cheng F, Yu J, Zhang X, et al. CircSEC31A Promotes the Malignant Progression of Non-Small Cell Lung Cancer Through Regulating SEC31A Expression via Sponging miR-376a[J]. Cancer Management and Research, 2020, Volume 12:11527-11539. IF:2.886
9. Soebagio H D, Fatmariyanti S, Paulus Sugianto N, et al. Detection of the Calcium and ATP Role in Apoptosis of Retinoblastoma Culture Cells through Caspase-3 Expression[J]. Research Journal of Pharmacy and Technology, 2019, 12(03): 1307-1314.
10. Al-Ziaydi A G, Al-Shammari A M, Hamzah M I, et al. Newcastle disease virus suppress glycolysis pathway and induce breast cancer cells death[J]. VirusDisease, 2020: 1-8.

