#### (本试剂盒仅供体外研究使用,不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K351-S

产品规格: 50 assays(48 samples)/ 100 assays(96 samples)

检测仪器:紫外-可见光分光光度计(545 nm)

# Elabscience<sup>®</sup>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液体、动植物组织及线粒体样本中的柠檬酸含量。

#### 检测原理

在酸性条件下, 六价铬 Cr(VI)还原成 Cr<sup>3+</sup>, 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 吸光度值的增加, 即可计算出样品中的柠檬酸含量。

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蛋白浓度,推荐使用本公司BCA 试剂盒进行测定(货号: E-BC-K318-M)。

#### 提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1) (50 assays)	规格 2 (Size 2) (100 assays)	保存方式 (Storage)
试剂一	缓冲液	45 mL× 2 瓶	45 mL×4 瓶	2-8°C
(Reagent 1)	(Buffer Solution)	13 1112 27,50	13 1112 1 7/4	保存3个月
试剂二	裂解液	   10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	2-8°C
(Reagent 2)	(Lysis Buffer)	TOTHENT	20 IIIL^1 /M	保存3个月
试剂三	还原试剂	   粉剂×1 瓶	   粉剂×1 瓶	2-8℃避光
(Reagent 3)	(Reducing Agent)	7,7,7,1,7,1	10 M 1 M	保存3个月
试剂四	显色剂	10 1 1 1 15	15 11 45	2-8℃避光
(Reagent 4)	(Chromogenic Agent)	10 mL×1 瓶	15 mL×1 瓶	保存3个月
试剂五	1 mmol/L 柠檬酸标准品	2 mL×1 瓶	2 mL×1 瓶	2-8°C
(Reagent 5)	(1 mmol/L CA Standard)	2 111112 1 7成	Z IIIL ^ I 和。	保存3个月

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:紫外-可见光分光光度计(545 nm),水浴锅,涡旋混匀仪,低温离心

机, 1 mL 比色皿

耗材: 吸水纸、擦镜纸

**试剂:** 双蒸水、生理盐水 (0.9% NaCl) 或 PBS (0.01 M, pH 7.4)

#### 试剂准备

① 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。

② 试剂三工作液的配制:

规格1,50Assays:

临用前加入10 mL试剂一, 充分溶解即可, 2-8℃条件下可保存7天。

规格2, 100Assays:

临用前加入20 mL试剂一, 充分溶解即可, 2-8℃条件下可保存7天。

③ 标准品溶液的配制:

临用前用双蒸水稀释成0.25 mmol/L柠檬酸标准液。

## 样本准备

#### ① 样本处理

见操作步骤样本中柠檬酸的提取。

#### 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(0.05-5.0 mmol/L),请参考下表稀释:

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
人血清	4-6	10%小鼠心组织	2-4
10%小鼠肾组织	2-4	10%小鼠脑组织	不稀释
10%大鼠肾组织	不稀释	10%小鼠肝组织	不稀释

注:稀释液为试剂一。

## 实验关键点

加样时需准确操作,测定前,试剂一置于30℃水浴中预热30 min 以上。

## 操作步骤

#### 样本中柠檬酸的提取

① 液体样本:直接检测。

③ 线粒体中柠檬酸的提取:

10 min, 取上清液, 待测。

- ② 组织中柠檬酸的提取: 称取约 0.1 g 组织, 加入 0.9 mL 试剂一, 冰上充分研磨, 11000×g, 4℃离心 10 min, 取上清液, 待测。
- 称取约 0.1 g组织, 加入 0.9 mL 试剂一, 冰上充分研磨, 随后 600 × g, 4℃离心 5 min; 取上清液至另一 EP 管中, 再 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); 向沉淀中加入 200 μL 试剂二, 涡旋混匀仪使其充分悬浮, 11000 × g 4℃离心

## 测定

- ① 空白管: 向 1.5 mL EP 管中加入 100 μL 双蒸水; 标准管: 向 1.5 mL EP 管中加入 100 μL 标准品; 测定管: 向 1.5 mL EP 管中加入 100 μL 上清液。
- ② 向步骤①各管中加入 700 μL 试剂一。
- ③ 向步骤②各管中加入 100 µL 试剂三工作液。
- ④ 向步骤③各管中加入100 μL 试剂四。
- ⑤ 涡旋混匀后,室温静置 30 min, 1 mL 石英比色皿,双蒸水调零,紫外-可见分光光度计于 545 nm 处测定 OD 值。

## 操作表

	空白管	测定管	标准管
双蒸水(μL)	100		
上清液(μL)		100	
标准品(µL)			100
试剂一(μL)	700	700	700
试剂三工作液(μL)	100	100	100
试剂四(μL)	100	100	100

涡旋混匀, 室温静置  $30 \, \text{min}$ ,  $1 \, \text{mL}$  石英比色皿, 双蒸水调零, 紫外-可见分光光度计于  $545 \, \text{nm}$  处测定 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 E-BC-K318-M)进行测定。

## 结果计算

#### 按血清(浆)样本的体积计算:

$$\frac{柠檬酸含量}{\text{(mmol/L)}} = \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \times f$$

#### 按组织鲜重计算:

柠檬酸含量 
$$= \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \times f \div \frac{m}{V}$$

#### 按线粒体蛋白含量计算:

$$\frac{\textit{柠檬酸含量}}{\textit{($\mu$mol/mg prot)}} = \frac{\Delta A_{l}}{\Delta A_{2}} \times c \; \div \; C_{\textit{pr}} \times f$$

#### 注解:

ΔA<sub>1</sub>: 样本 OD 值-空白 OD 值

ΔA2: 标准 OD 值-空白 OD 值

c: 标准品浓度 (0.25 mmol/L)

f: 样本加入检测体系前稀释的倍数

m: 称取组织样品质量(0.1 g)

V:缓冲液的体积(0.9 mL)

Cpr: 上清液蛋白质含量(mg/mL)

## 附录1 关键数据

### 1. 技术参数

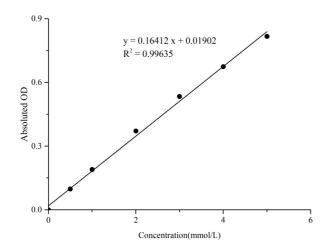
检测范围	0.05-5.0 mmol/L	平均批间差	5.4 %
灵敏度	0.05 mmol/L	平均批内差	4.2 %
平均回收率	96 %		

## 2. 标准曲线(数据仅供参考)

①标准品加样量100 µL,按照操作表进行操作,读取各点OD值,如下表所示:

标准品浓度 (mmol/L)	0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
OD 值	0.101	0.202	0.288	0.466	0.580	0.785	0.909
	0.105	0.200	0.297	0.481	0.694	0.769	0.931
平均 OD 值	0.103	0.201	0.293	0.474	0.637	0.777	0.920
绝对 OD 值	0.000	0.098	0.190	0.371	0.534	0.674	0.817

②制标准曲线,如下图所示:



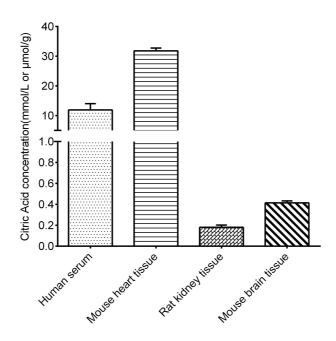
### 附录2 实例分析

#### 例如检测人血清(数据仅供参考):

将血清: 试剂一=1:4稀释,取100 μL稀释后的人血清,按操作表检测,结果如下:测定孔平均OD值为0.556,空白OD值为0.119,标准管平均OD值为0.173,计算结果为:

柠檬酸含量 (mmol/L) = (0.556 - 0.119) ÷ (0.173 - 0.119) × 0.25 × 5 = 10.116 mmol/L

按照说明书操作,测定人血清(稀释倍数5,加样量100  $\mu$ L)、小鼠心组织(10%组织匀浆,稀释倍数3,加样量100  $\mu$ L)、大鼠肾脏组织(10%组织匀浆,加样量100  $\mu$ L)、和小鼠脑组织(10%组织匀浆,加样量100  $\mu$ L)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
测定管内出现黑色 悬浮物	样本浓度太高	选择合适稀释倍数,重新检测
	样本保存时间过长或保存	取新鲜样本, 重新检测
	不当	
样本测量结果>5	样本浓度太高	选择合适稀释倍数,重新检测
mmol/L		

#### 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
- 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
- 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
- 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-PGC1α signalling pathway. Adipocyte. 2022;11 (1):562-571. IF:3.553
- 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
- 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
- Soebagjo 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.