

(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® 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 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 (Reagent 1) | 缓冲液 (Buffer Solution) | 45 mL×2 瓶 | 45 mL×4 瓶 | 2-8℃ 保存 3 个月 |
| 试剂二 (Reagent 2) | 裂解液 (Lysis Buffer) | 10 mL×1 瓶 | 20 mL×1 瓶 | 2-8℃ 保存 3 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 3 个月 |
| 试剂四 (Reagent 4) | 显色剂 (Chromogenic Agent) | 10 mL×1 瓶 | 15 mL×1 瓶 | 2-8℃避光 保存 3 个月 |
| 试剂五 (Reagent 5) | 1 mmol/L 柠檬酸标准品 (1 mmol/L CA Standard) | 2 mL×1 瓶 | 2 mL×1 瓶 | 2-8℃ 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°C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°C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°C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。

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， $11000 \times g$ ， 4°C 离心 10 min，取上清液，待测。

③ 线粒体中柠檬酸的提取：

称取约 0.1 g 组织，加入 0.9 mL 试剂一，冰上充分研磨，随后 $600 \times g$ ， 4°C 离心 5 min；取上清液至另一 EP 管中，再 $11000 \times g$ ， 4°C 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， $11000 \times g$ 4°C 离心 10 min，取上清液，待测。

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 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。 | | | |

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：

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

按组织鲜重计算：

$$\begin{aligned} \text{柠檬酸含量} &= \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \times f \div \frac{m}{V} \\ (\mu\text{mol/g tissue}) & \end{aligned}$$

按线粒体蛋白含量计算：

$$\begin{aligned} \text{柠檬酸含量} &= \frac{\Delta A_1}{\Delta A_2} \times c \div C_{\text{pr}} \times f \\ (\mu\text{mol/mg prot}) & \end{aligned}$$

注解：

ΔA_1 ：样本 OD 值-空白 OD 值

ΔA_2 ：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）

C_{pr} ：上清液蛋白质含量(mg/mL)

附录1 关键数据

1. 技术参数

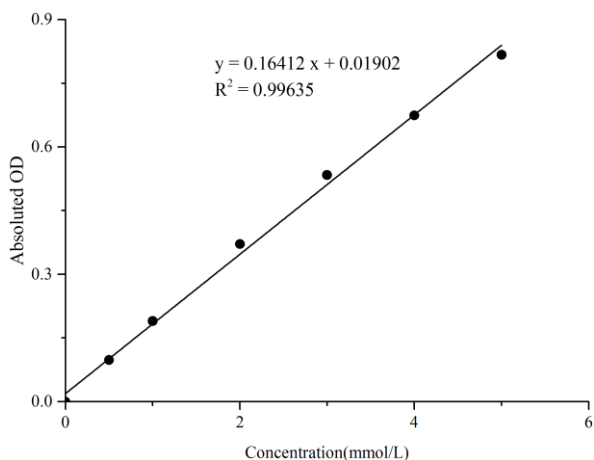
| | | | |
|-------|-----------------|-------|-------|
| 检测范围 | 0.05-5.0 mmol/L | 平均批间差 | 5.4 % |
| 灵敏度 | 0.05 mmol/L | 平均批内差 | 4.2 % |
| 平均回收率 | 96 % | | |

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①标准品加样量100 μ L, 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:



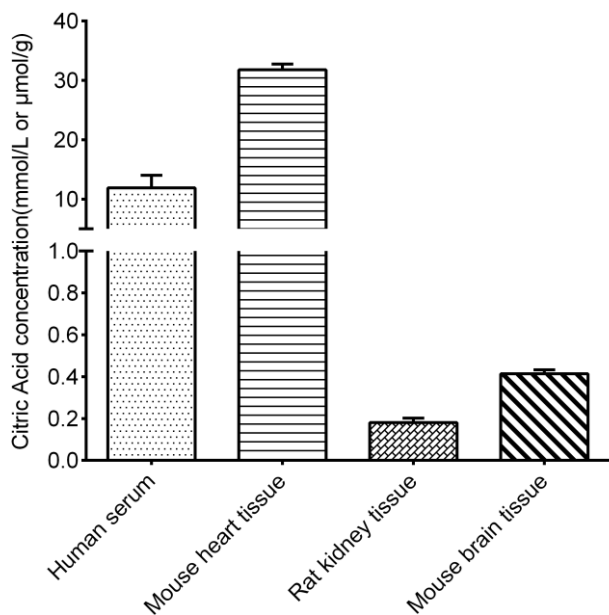
附录2 实例分析

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:

$$\text{柠檬酸含量 (mmol/L)} = (0.556 - 0.119) \div (0.173 - 0.119) \times 0.25 \times 5 = 10.116 \text{ mmol/L}$$

按照说明书操作, 测定人血清(稀释倍数5, 加样量100 μL)、小鼠心组织(10%组织匀浆, 稀释倍数3, 加样量100 μL)、大鼠肾脏组织(10%组织匀浆, 加样量100 μL)、和小鼠脑组织(10%组织匀浆, 加样量100 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 |
|------------------|---------------|---------------|
| 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不当 | 取新鲜样本,重新检测 |
| 样本测量结果 >5 mmol/L | 样本浓度太高 | 选择合适稀释倍数,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. 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.

