

CheKine™ 柠檬酸（CA）含量检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1024

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

	适用样本：动植物组织、细菌或细胞、线粒体、血清（浆）或其他液体
	保质期：-20℃，避光保存 6 个月

01 背景与原理

柠檬酸（CA）是生物体内常见的有机酸，是重要的食品风味物质。此外，柠檬酸是三羧酸循环第一步反应的产物。

本试剂盒检测原理是酸性条件下，柠檬酸还原 Cr^{6+} 生成 Cr^{3+} ，在 545 nm 处有特征吸收峰；通过测定 545 nm 吸光值，即可计算出样本中柠檬酸含量。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Reagent I	70 mL	70 mL×2	4℃，避光保存
Reagent II	12 mL	24 mL	4℃
Reagent III	0.25 mL	0.5 mL	-20℃，避光保存
Reagent IV	Powder×1 vial	Powder×1 vial	RT，避光保存
Reagent V	1.2 mL	2.4 mL	4℃，避光保存
Standard	0.25 mL	0.25 mL	4℃，避光保存

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 545 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水、PBS	检测/清洗样本用
其他	匀浆器（组织样本）、水浴锅、低温离心机、1.5 mL 离心管、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 **2-3** 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细菌或细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。柠檬酸提取液不能用于蛋白含量测定，如需测定蛋白含量，用去离子水重新提取样本后进行蛋白浓度测定。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

05-1-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Reagent I	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存
Reagent II	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent III	即用型；使用前平衡到室温	-20℃避光保存，易挥发试剂，用完后尽快密封
Working Reagent IV	临用前配制；48 T 加入 1.25 mL Reagent I，96 T 加入 2.5 mL Reagent I，充分溶解	未用完的试剂 4℃避光保存 2 周
Reagent V	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存；易致癌物质，实验过程中，需佩戴手套，避免溅到皮肤上
Standard	即用型；使用前平衡到室温	4℃避光保存

05-2 样本制备

注意：建议使用新鲜样本。如果不立即进行实验，样本可在 **-80℃** 保存 **1** 个月。测定时，应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时，需在 **4 h** 内完成样品解冻。

- 动植物组织：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Reagent I，冰浴匀浆，11000 g，4℃离心 10 min，取上清液，置冰上待测。

- **细菌或细胞：**收集 5×10^6 个细菌或细胞，用冷 PBS 清洗细菌或细胞，800 g 离心 2 min，弃上清液。加入 1 mL Reagent I，冰浴超声波破碎细菌或细胞 3 min（功率 30% 或 300 W，超声 3 s，间隔 7 s），11000 g，4℃ 离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
- **线粒体中柠檬酸提取：**称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Reagent I，冰浴匀浆，600 g，4℃ 离心 5 min；取上清至另一离心管中，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 200 μ L Reagent II，以及 2 μ L Reagent III，充分悬浮溶解，11000 g，4℃ 离心 10 min，取上清液，置冰上待测。
- **血清（浆）等液体样本：**取 0.1 mL 液体加 0.9 mL Reagent I，充分混匀，11000 g，4℃ 离心 10 min，取上清液，置冰上待测。

05-3 实验步骤

1. **酶标仪准备：**预热 30 min 以上，调节波长到 545 nm。
2. **将 Reagent I 置于 30℃ 预热 30 min。**
3. **检测体系配制：**在 96 孔板中按照如下方式操作，空白孔和标准孔只需做 1-2 次：

试剂	空白孔（ μ L）	标准孔（ μ L）	测定孔（ μ L）
样本	0	0	20
Standard	0	20	0
去离子水	20	0	0
Reagent I	140	140	140
Working Reagent IV	20	20	20
Reagent V	20	20	20

4. **吸光度检测：**混匀后，室温静置 30 min，测定 545 nm 处的吸光度。空白孔记为 $A_{\text{空白}}$ ，标准孔记为 $A_{\text{标准}}$ ，测定孔记为 $A_{\text{测定}}$ 。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn)>进入“技术中心”>查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$ 。

2. CA 含量的计算

- 按蛋白浓度计算：

$$CA(\mu\text{mol}/\text{mg prot}) = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) = 2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$
- 按样本鲜重计算：

$$CA(\mu\text{mol}/\text{g}) = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样总}} \div W \times n = 2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times n$$
- 按细菌或细胞数量计算：

$$CA(\mu\text{mol}/10^4) = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样总}} \div N \times n = 2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div N \times n$$

● 按液体体积计算：

$$CA(\mu\text{mol}/\text{mL}) = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times F = 20 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}$$

● 线粒体中 CA 含量计算：

$$CA(\mu\text{mol}/\text{g}) = C_{\text{标准}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{重悬}} \div W \times n = 0.404 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times n$$

$C_{\text{标准}}$ ：标准品的浓度，2 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ； $V_{\text{样}}$ ：加入的样本体积，0.02 mL； $V_{\text{样总}}$ ：上清液总体积，1 mL； $V_{\text{重悬}}$ ：重悬沉淀体积，0.202 mL； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样本质量，g； n ：样本稀释倍数； N ：细菌或细胞数量，以 10^4 为单位（例如细菌数量为 5×10^6 ， $N=500$ ）； F ：液体样本稀释倍数，(0.1 mL 样本+0.9 mL Reagent I) $\div$ 0.1 mL 样本=10。

07 结果展示

示例-1：取 0.098 g 小鼠肺脏，按上述步骤操作，用 96 孔板测得 $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}} = 0.349 - 0.091 = 0.258$ ， $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}} = 0.256 - 0.091 = 0.165$ ，按样本鲜重计算含量得： $CA(\mu\text{mol}/\text{g}) = 2 \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}} \div W \times n = 31.91 \mu\text{mol}/\text{g}$ 。

08 FAQ

● 检测得到的样本 $\Delta A_{\text{测定}}$ 过高或者过低怎么办？

如果样本 $\Delta A_{\text{测定}} > 0.5$ ，样本需用去离子水适当进行稀释后，再进行实验，结果乘以稀释倍数，或减少提取用样本量。若反应 30 min 后有明显的黑色小颗粒，属于正常现象，需将样本稀释后再测。如果样本的 $\Delta A_{\text{测定}} < 0.01$ ，可适当提高样本量。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1230	CheKine™ 琥珀酸脱氢酶（SDH）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1240	CheKine™ α -酮戊二酸脱氢酶（ α -KGDH）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1270	CheKine™ 丙酮酸脱氢酶（PDH）活性检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 柠檬酸（CA）含量检测流程示意图

(Abbking 货号：KTB1024)

