

线粒体柠檬酸 (Mitochondrion citric acid, MCA) 含量试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

MCA 是线粒体三羧酸循环的第一个中间产物, 由柠檬酸合酶催化乙酰 CoA 与草酰乙酸合成, 其含量是三羧酸循环强度的主要指标之一。

配合测定丙酮酸含量、丙酮酸脱氢酶活性、乙酰 CoA 含量、柠檬酸合酶活性和 MCA 含量, 其中 (1) 丙酮酸含量和丙酮酸脱氢酶活性变化可以反映糖酵解进行程度, (2) 综合分析丙酮酸含量、丙酮酸脱氢酶活性和乙酰 CoA 含量变化可以反映脂肪酸 β -氧化途径提供的乙酰 CoA 情况, (3) 乙酰 CoA 含量、柠檬酸合酶活性和 MCA 含量变化可以反映三羧酸循环进行状况。

测定原理:

MCA 在柠檬酸裂解酶的作用下, 生成 α -酮酸 (草酰乙酸); 在弱酸性条件下, α -酮酸进一步与苯肼反应, 生成相应的 α -酮酸苯腙; α -酮酸苯腙在 330nm 处有吸收峰, 该波长下吸光度的变化程度可反映出 MCA 的含量。

组成:

产品名称	KC010-100T/96S	Storage
酸性提取液: 液体	100ml	4°C
碱性提取液: 液体	100ml	4°C
试剂一: 液体	6ml	4°C
试剂二: 液体	2ml	4°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	4°C
标准液: 液体	1ml	4°C
说明书	一份	

试剂三: 粉剂 \times 1 瓶, 4°C 保存; 临用前加入 6ml 蒸馏水充分溶解待用; 用不完的试剂 4°C 保存;
标准液: 液体 1ml \times 1 支, 10 μ mol/ml 柠檬酸标准液, 4°C 保存。

自备仪器和用品:

分光光度计/酶标仪、水浴锅、可调式移液枪、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、研钵、蒸馏水。

线粒体中柠檬酸提取:

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



称 0.05~0.1g 样品（建议称 0.1g 样本），加入 0.5ml 酸性提取液，冰上充分研磨，600g/min 4℃离心 5min；取上清至另一 EP 管中，11000g/min 4℃离心 10min，弃上清（取 300μl 该上清液和 300μl 碱性提取液中和后可用于细胞质 CA 含量测定）；沉淀即线粒体，向沉淀中加入 0.5ml 酸性提取液，充分悬浮溶解，超声波破碎（功率 20%，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次），取此溶液 300μl 和 300μl 碱性提取液中和，混匀，置冰上待测（不可用于蛋白质含量测定）。

测定步骤：

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长到 330nm，蒸馏水调零。
- 2、试剂一、二和三 37℃预热 10min。
- 3、样本测定：

空白管和标准管只需要各做一个。

试剂名称(μl)	空白管	标准管	测定管
试剂一	60	60	60
蒸馏水	60		
标准液		60	
样本			60
试剂二	20	20	20
试剂三	60	60	60

充分混匀，330nm 立即测定初始吸光值 A1 和 37℃孵育 30min 后的吸光值 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。

柠檬酸含量计算：

(1) 按蛋白浓度计算

柠檬酸含量(μmol/mg prot)=[C 标准管×(ΔA 测定管 - ΔA 空白管)÷(ΔA 标准管 - ΔA 空白管)×V 样]÷ (V 样 ÷Cpr) =10×(ΔA 测定管 - ΔA 空白管)÷(ΔA 标准管 - ΔA 空白管)÷Cpr

蛋白质含量需要另外测定。

(2) 按样本鲜重计算

柠檬酸含量(μ mol/g 鲜重)=[C 标准管×(ΔA 测定管 - ΔA 空白管)÷(ΔA 标准管 - ΔA 空白管)×V 样]÷ (W×V 样 ÷V 样总) =10×(ΔA 测定管 - ΔA 空白管)÷(ΔA 标准管 - ΔA 空白管)÷W

C 标准管：标准液浓度，10μmol/ml； V 样：加入反应体系中样本体积：0.06ml； V 样总：加入提取液体积：1ml； Cpr：样品蛋白浓度，mg/ml； W：样本质量，g。

注意：最低检测限为 10nmol/mg prot 或 1μmol/g 鲜重。

