

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0394

Size: 100T/96S

线粒体柠檬酸(MCA)含量检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、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。

二、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。

三、需自备的仪器和用品:

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 (ZC-1036: UV 板)、研钵、蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
酸性提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C 保存	
碱性提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 6mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 2mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂三	粉剂×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×1 支	4°C 保存	10 μmol/mL 柠檬酸标准液

五、线粒体中柠檬酸提取：

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°C 离心 5min; 取上清至另一 EP 管中, 11000g/min 4°C 离心 10min, 弃上清 (取 300 μL 该上清液和该上清液和 300 μL 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 300 μL 和 300 μL 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)。

六、测定步骤：

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长到 330nm，蒸馏水调零。
- 2、试剂一、二和三 37°C 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°C 孵育 30min 后的吸光值 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。

七、柠檬酸含量计算：

1. 按蛋白浓度计算

柠檬酸含量($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$) = $[C \text{ 标准管} \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\Delta A \text{ 标准管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 样}] \div (V \text{ 样} \div C_{\text{pr}}) = 10 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\Delta A \text{ 标准管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div C_{\text{pr}}$

蛋白质含量需要另外测定。

2. 按样本鲜重计算

柠檬酸含量($\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}$) = $[C \text{ 标准管} \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\Delta A \text{ 标准管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 样}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) = 10 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\Delta A \text{ 标准管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$

C 标准管：标准液浓度，10 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ；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；C_{pr}：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 1 $\mu\text{mol}/\text{g}$ 鲜重。