

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-S0670

Size: 25T/24S

## 线粒体柠檬酸（MCA）检测试剂盒说明书

### 分光光度法

\*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：

CA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CA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 $\beta$ -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CA含量变化可以反映三羧酸循环进行状况。

#### 二、测定原理：

CA在柠檬酸裂解酶的作用下，生成 $\alpha$ -酮酸（草酰乙酸）；在弱酸性条件下， $\alpha$ -酮酸进一步与苯肼反应，生成相应的 $\alpha$ -酮酸苯腙； $\alpha$ -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CA的含量。

#### 三、需自备的仪器和用品：

分光光度计、水浴锅、可调式移液枪、1mL 石英比色皿、研钵和蒸馏水。

#### 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 25mL×1 瓶  | 4℃保存 |                                    |
| 碱性提取液 | 液体 25mL×1 瓶  | 4℃保存 |                                    |
| 试剂一   | 液体 7.5mL×1 瓶 | 4℃保存 |                                    |
| 试剂二   | 液体 2.5mL×1 瓶 | 4℃保存 |                                    |
| 试剂三   | 粉剂×1 瓶       | 4℃保存 | 临用前加入 7.5mL 蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂 4℃保存； |
| 标准品   | 液体 1mL×1 支   | 4℃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℃离心5min；取上清至另一EP管中，11000g/min 4℃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、分光光度计预热30min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：

空白管和标准管通常只需要各做一个。

| 试剂名称 (μL) | 空白管 | 标准管 | 测定管 |
|-----------|-----|-----|-----|
| 试剂一       | 300 | 300 | 300 |
| 蒸馏水       | 300 |     |     |
| 标准液       |     | 300 |     |
| 样本        |     |     | 300 |
| 试剂二       | 100 | 100 | 100 |
| 试剂三       | 300 | 300 | 300 |

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， $\Delta A = A2 - A1$ 。

## 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 (ZC-S0470)。

### (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，0.3mL； 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  $10\text{nmol}/\text{mg prot}$  或  $1 \mu\text{mol}/\text{g 鲜重}$ 。