

上海茁彩生物科技有限公司
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

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

分光光度法

注意：正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

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 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CA含量变化可以反映三羧酸循环进行状况。

测定原理：

CA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 -酮酸进一步与苯胍反应，生成相应的 α -酮酸苯胍； α -酮酸苯胍在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。

自备仪器和用品：

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。

试剂的组成和配制：

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 μ mol/mL 柠檬酸标准液

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 μ L该上清液和该上清液和300 μ L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 μ L和300 μ L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°C孵育30min 后的吸光值A2, $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

柠檬酸含量计算:

(1) 按蛋白浓度计算

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

= $10 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\Delta A \text{ 标准管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div \text{Cpr}$

蛋白质含量需要另外测定。

(2) 按样本鲜重计算

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

= $10 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\Delta A \text{ 标准管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$

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 $1 \mu\text{mol}/\text{g 鲜重}$ 。