

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

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

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 CA 的含量。

组成:

产品名称	KC009-25T/24S	KC009-50T/48S	Storage
酸性提取液: 液体	25ml	50ml	4°C
碱性提取液: 液体	25ml	50ml	4°C
试剂一: 液体	7.5ml	15ml	4°C
试剂二: 液体	2.5ml	5ml	4°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	1 瓶	4°C
标准品: 液体	1 支	1 支	4°C
说明书	一份		

KC009-25T/24S:

试剂三: 粉剂 \times 1 瓶, 4°C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°C保存;

标准品: 液体 1ml \times 1 支, 10 μ mol/ml 柠檬酸标准液, 4°C保存。

KC009-50T/48S:

试剂三: 粉剂 \times 1 瓶, 4°C保存; 临用前加入 15ml 蒸馏水充分溶解待用; 用不完的试剂 4°C保存。

标准品: 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、水浴锅、可调式移液枪、1ml 石英比色皿、研钵和蒸馏水。

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 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， $\Delta A = A2 - A1$ 。

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，0.3ml； 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 $\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}$ 。

