

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。

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。

试剂组成和配制：

酸性提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存。

碱性提取液：液体100mL×1瓶，4℃保存。

试剂一：液体6mL×1瓶，4℃保存。

试剂二：液体2mL×1瓶，4℃保存。

试剂三：粉剂×1瓶，4℃保存；临用前加入6mL蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂4℃保存；

标准液：液体1mL×1支，10 μ mol/mL柠檬酸标准液，4℃保存。

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°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, $\Delta A = A2 - A1$ 。

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 ; 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 $1\mu\text{mol}/\text{g鲜重}$ 。