

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

分光光度法 25 管/24 样

注 意：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。

试剂组成和配制：

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，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，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 $10\text{nmol}/\text{mg prot}$ 或 $1\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}$ 。