

## 线粒体柠檬酸（MCA）含量检测试剂盒（微量法）

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定。

产品货号：BA1403

产品规格：100管/96样

### 产品简介：

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 $\beta$ -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MCA含量变化可以反映三羧酸循环进行状况。

MCA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MCA的含量。

### 产品组成和配制：

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 $\mu$ mol/mL柠檬酸标准液，4℃保存。

### 需自备的仪器和用品：

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。

### 操作步骤：

#### 一、样本处理：

##### 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 $\mu$ L该上清液和300 $\mu$ L碱性提取液中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 $\mu$ L和300 $\mu$ L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）。

#### 二、测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热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：

空白管和标准管只需要各做一个。

试剂名称( $\mu$ L)	空白管	标准管	测定管
试剂一	60	60	60
蒸馏水	60		



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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， $\Delta A = A2 - A1$ 。

### 三、柠檬酸含量计算：

#### (1) 按蛋白浓度计算

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

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

蛋白质含量需要另外测定。

#### (2) 按样本鲜重计算

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

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

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：0.06mL；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10nmol/mg prot或1 $\mu\text{mol}/\text{g}$ 鲜重。



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com