



线粒体柠檬酸检测试剂盒

MCA Assay Kit

微量法

产品编号：AK407M

产品规格：100T/96S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
ES407-1	100mLx1 瓶	4℃保存；
ES407-2	100mLx1 瓶	4℃保存；
AK407-A	6mLx1 瓶	4℃保存；
AK407-B	2mLx1 瓶	4℃保存；
AK407-C	粉剂x1 瓶	临用前加入 15mL 蒸馏水充分溶解待用；剩余试剂 4℃保存。
AK407-S	1mLx1 支	(10μmol/mL 柠檬酸标准液) 4℃保存。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介：

意义：线粒体柠檬酸 (Mitochondrion citric acid, 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。

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。

自备用品：

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。

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 ES407-1，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 ES407-2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 ES407-1，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 ES407-2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. AK407-A、AK407-B 和 AK407-C 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	空白管 (μL)	标准管 (μL)	测定管 (μL)
AK407-A	60	60	60
蒸馏水	60		
标准品		60	
样本			60
AK407-B	20	20	20
AK407-C	60	60	60

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. 按样本蛋白浓度计算

柠檬酸含量 ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$)

$$= [\text{C 标准管} \times (\Delta\text{A 测定管} - \Delta\text{A 空白管}) \div (\Delta\text{A 标准管} - \Delta\text{A 空白管}) \times \text{V 样}] \div (\text{V 样} \div \text{Cpr})$$

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

2. 按样本鲜重计算

柠檬酸含量 ($\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}$)

$$= [\text{C 标准管} \times (\Delta\text{A 测定管} - \Delta\text{A 空白管}) \div (\Delta\text{A 标准管} - \Delta\text{A 空白管}) \times \text{V 样}] \div (\text{W} \times \text{V 样} \div \text{V 样总})$$

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

注： 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。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))

注意事项：

最低检测限为 $10\text{nmol}/\text{mg prot}$ 或 $1\mu\text{mol}/\text{g 鲜重}$ 。