



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

线粒体柠檬酸检测试剂盒(微量法)

货号: R42060

规格: 100T/96S

保质期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES407-1	100mL×1瓶	2-8℃保存;
ES407-2	100mL×1瓶	2-8℃保存;
试剂-A	6mL×1瓶	2-8℃保存;
试剂-B	2mL×1瓶	2-8℃保存;
试剂-C	粉剂×1瓶	临用前加入15mL蒸馏水充分溶解待用; 剩余试剂2-8℃保存。
试剂-D	1mL×1支	(10μmol/mL柠檬酸标准液)2-8℃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. 试剂-A、试剂-B 和 试剂-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)
试剂-A	60	60	60
蒸馏水	60		
标准品		60	
样本			60
试剂-B	20	20	20
试剂-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:

檬酸含量计算:

1. 按样本蛋白浓度计算

柠檬酸含量 ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$) = $[C \text{ 标准管} \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\Delta A \text{ 标准管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 样}] \div (V \text{ 样} \div C_{\text{pr}}) = 10 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\Delta A \text{ 标准管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div C_{\text{pr}}$



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

2. 按样本鲜重计算

柠檬酸含量 ($\mu\text{mol/g}$ 鲜重) = $[C \text{ 标准管} \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\Delta A \text{ 标准管} - \Delta A \text{ 空白管}) \times V \text{ 样}] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) = 10 \times (\Delta A \text{ 测定管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div (\Delta A \text{ 标准管} - \Delta A \text{ 空白管}) \div W$

注: C 标准管: 标准液浓度, $10\mu\text{mol/mL}$; 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。

注意事项:

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



源叶