



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(分光光度法)

货号: R42061

规格: 25T/24S

保质期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
试剂-A	50 mL×1瓶	4℃保存;
试剂-B	5 mL×1 瓶	4℃保存;
试剂-C	50uL×1支	-20℃保存;
试剂-D	粉剂×1瓶	室温保存。临用前配制, 加入2.5mL 试剂-A充分溶解, 一周内使用完。
试剂-E	2.5 mL×1瓶	4℃避光保存;
标准品	1ml×1支	250μmol/L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: 酸性条件下, 柠檬酸还原 Cr^{6+} 生成 Cr^{3+} , 在 545nm 处有特征吸收峰; 通过测定 545nm 吸光值的增加, 即可计算出样品中柠檬酸含量。

自备用品:



可见分光光度计、1ml 玻璃比色皿、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

样本的前处理:

按照组织质量 (g): 试剂-A 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂-A) 进行冰浴匀浆, 600g/min, 4℃离心 5min; 取上清至另一 EP 管中, 11000g, 4℃离心 10min, 弃上清 (此上清液可用于细胞质 CA 含量测定); 向沉淀中加 试剂-B 200μl, 以及 试剂-C 2μl, 充分悬浮溶解, 11000g, 4℃离心 10min, 取上清液, 待测。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30 min, 调节波长到 545 nm, 蒸馏水调零。
2. 将 试剂-A 置于 30℃水浴中预热 30min。
3. 在 EP 管或 1 mL 玻璃比色皿中加入下列试剂

试剂名称	空白管(μL)	标准管(μL)	测定管(μL)
蒸馏水	100		
标准液		100	
上清液			100
试剂-A	700	700	700
试剂-D	100	100	100
试剂-E	100	100	100

充分混匀后室温静置30min,于545nm测定吸光度,记录为: A空白管, A标准管, A测定管。注意: 空白管和标准管只需测定 1-2 次

柠檬酸(CA)计算公式:

1. 按组织质量计算:

柠檬酸含量 (μmol/g) = [C 标准液×(A 测定管-A 空白管)÷(A 标准管-A 空白管)]×V 总÷W = 0.25×(A 测定管-A 空白管)÷(A 标准管-A 空白管)÷W

注: C 标准液: 250 μmol/L; V 总: 上清液体积, 1.0 mL=0.001 L; W: 样品质量, g。

2. 按蛋白含量计算



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

柠檬酸含量 ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$) = $[C \text{ 标准液} \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管})] \div Cpr = 0.25 \times (A \text{ 测定管} - A \text{ 空白管}) \div (A \text{ 标准管} - A \text{ 空白管}) \div Cpr$

注: C 标准液: $250 \mu\text{mol}/\text{L} = 0.25 \mu\text{mol}/\text{mL}$; Cpr: 上清液蛋白质含量, mg/mL 。

注意事项:

1. 样品处理等过程均需要在冰上进行;
2. 试剂-D 需现配现用, 配置好的一周内使用完;
3. 试剂-E 为易致癌物质, 实验过程中, 需佩戴手套, 避免溅到皮肤上;
4. 试剂-A 不能用于蛋白含量测定, 如需测定蛋白含量, 需另取组织;
5. 若反应 30min 后有明显的黑色小颗粒, 属于正常现象, 需将样本稀释后再测。



源叶