

线粒体柠檬酸(MCA)含量检测试剂盒说明书

Mitochondrial Citric Acid Assay Kit

可见分光光度法

货号: AK407V

规格: 25T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK407-A	50 mL×1 瓶	4℃保存;
AK407-B	5 mL×1 瓶	4℃保存;
AK407-C	50μL×1 支	-20℃保存;
AK407-D	粉剂×1 瓶	室温保存。临用前配制, 加入 2.5mL AK407-A 充分溶解, 一周内使用完。
AK407-E	2.5 mL×1 瓶	4℃避光保存;
AK407-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): AK407-A 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL AK407-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 AK407-B 200μl, 以及 AK407-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 AK407-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
AK407-A	700	700	700
AK407-D	100	100	100

AK407-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:

$$\begin{aligned}\text{柠檬酸含量 } (\mu\text{mol/g}) &= [\text{C 标准液} \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管})] \times V_{\text{总}} \div W \\ &= 0.25 \times (\text{A 测定管} - \text{A 空白管}) \div (\text{A 标准管} - \text{A 空白管}) \div W\end{aligned}$$

注: C 标准液: 250 $\mu\text{mol/L}$; $V_{\text{总}}$: 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

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

注: C 标准液: 250 $\mu\text{mol/L}$ =0.25 $\mu\text{mol/mL}$; 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. AK407-D 需现配现用, 配置好的一周内使用完;
3. AK407-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. AK407-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。