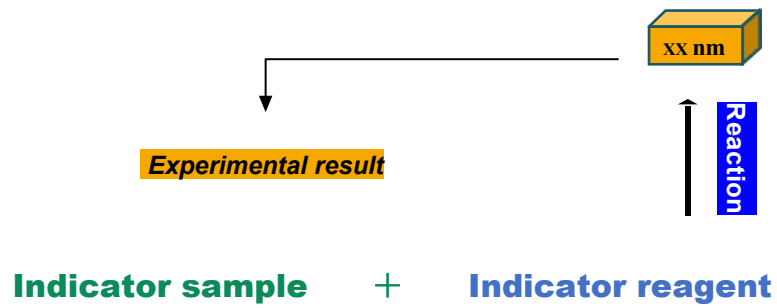


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

## 柠檬酸合酶(CS) 检测试剂盒说明书 可见分光光度法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

### 产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体50mL×1 瓶	-20℃保存	-
试剂二	液体10mL×1 瓶	-20℃保存	-
试剂三	液体1mL×1 支	-20℃保存	-
试剂四	液体50mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂五	粉剂×2 支	4℃保存	临用前加入800 μL 无水乙醇，用不完的试剂4℃保存一周
试剂六	粉剂×1 支	-20℃保存	临用前加入1600 μL 蒸馏水，用不完的试剂仍-20℃保存
试剂七	粉剂×2 支	-20℃保存	临用前加入800 μL 蒸馏水，用不完的试剂仍-20℃保存

### 产品说明：

CS (EC 2.3.3.1) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞的线粒体基质中，是三羧酸循环第一个限速酶，是三羧酸循环主要调控位点之一。CS 催化乙酰CoA 和草酰乙酸产生柠檬酰辅酶A，进一步水解产生柠檬酸；该反应促使无色的DTNB 转变成黄色的TNB，在 412nm 处有特征吸光值。

### 需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰、无水乙醇和蒸馏水

### 操作步骤：

#### 一、样本的前处理：

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

1. 称取约0.1g 组织或收集500万细胞，加入1mL 试剂一和10uL 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 将匀浆600g，4℃离心5min。
3. 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心10min。
4. 上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的CS（此步可选做）。
5. 在步骤（4）中的沉淀中加入200uL 试剂二和2uL 试剂三，超声波破碎（冰浴，功率20%或200W，超声3 秒，间隔10 秒，重复30 次），用于线粒体CS 测定。

#### 二、测定步骤：

- 1、分光光度计预热30min 以上，调节波长至412nm，蒸馏水调零。
- 2、将试剂四、五、六和七在37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）孵育5min

### 3、样本测定

试剂名称 (μL)	测定管
试剂四	780
试剂五	30
试剂六	30
样本	30
试剂七	30

将上述试剂按顺序加入1 mL 玻璃比色皿中，加试剂七的同时开始计时，在412nm 波长下记录20 秒时的初始吸光度A1 和反应2min 后的吸光值A2，计算  $\Delta A=A_2-A_1$ 。

#### 三、CS 活性计算：

##### (1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg 组织蛋白每分钟催化产生1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1100 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

##### (2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每g 组织每分钟催化产生1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 222.2 \times \Delta A \div W$$

##### (3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每1 万个细菌或细胞每分钟催化产生1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min /104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.4444 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， $9 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：TNB 摩尔消光系数， $1.36 \times 10^4$  L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.03 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500 万。