

上海茁彩生物科技有限公司  
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0581

Size: 50T/48S

## 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

#### 一、测定意义：

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。

#### 二、测定原理：

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。

#### 三、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

#### 四、试剂的组成和配置：

| 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  |

#### 五、操作步骤：

##### 1. 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。

## 2. 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°C (哺乳动物) 或25°C (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1mL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  $\Delta A = A2 - A1$ 。

## 六、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。

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

$$= 1100 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

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

(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。

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

$V_{\text{反总}}$ ：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； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.03mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，0.202mL； $T$ ：反应时间，2 min； $C_{\text{pr}}$ ：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。