

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-S0583

Size: 10T/9S

## 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 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 10mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 2mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体 0.2mL×1 支	-20℃保存	
试剂四	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂×1 支	4℃保存	临用前加入 320 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 320 μL 蒸馏水，用不完的试剂仍-20℃保存
试剂七	粉剂×1 支	-20℃保存	临用前加入 320 μL 蒸馏水，用不完的试剂仍-20℃保存

#### 五、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）。

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。

## 六、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（ $\mu\text{L}$ ）	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  $\Delta A=A2-A1$ 。

## 七、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。

$$\text{CS (nmol/min / } 10^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 0.4444 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$ ：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，0.03 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，0.202 mL；  
 $T$ ：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。