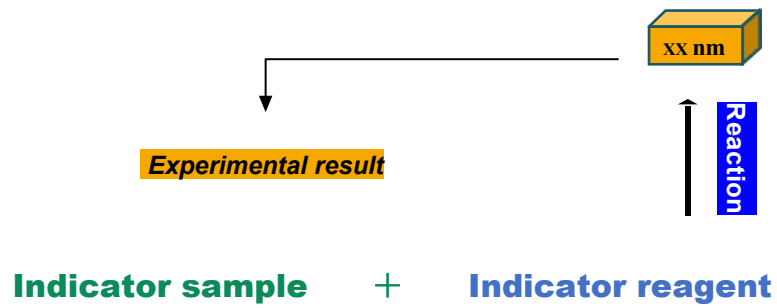


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co., Ltd.



生化检测原理示意图

## 柠檬酸合酶 (citrate synthase, CS) 试剂盒说明书

### 微量法

**注意:** 正式测定之前选择2-3个预期差异大的样本做预测定。

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。

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。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰、无水乙醇和蒸馏水

试剂组成和配制:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 100mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	-20℃保存	
试剂三	液体 1.5mL×1 支	-20℃保存	
试剂四	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂×1 瓶	4℃保存	
试剂六	粉剂×1 支	-20℃保存	临用前加入 1mL 蒸馏水, 用不完的试剂仍-20℃保存

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。

测定步骤:

1、分光光度计或酶标仪预热30min以上, 调节波长至412nm, 蒸馏水调零。

2、样本测定

(1) 在试剂五中加入1mL无水乙醇和22mL试剂四, 混匀, 37℃ (哺乳动物) 或25℃ (其它物种) 孵育5min; 现配现用;

(2) 在微量石英比色皿或96孔板中加入10 μL样本、220 μL试剂五和10 μL试剂六，混匀，记录412nm处20秒时的初始吸光度A1和2分20秒时的吸光度A2，计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

CS 活性计算：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

(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1nmol TNB定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 880 \times \Delta A \div Cpr$$

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1nmol TNB定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 177.8 \times \Delta A \div W$$

(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1nmol TNB定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.3556 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， $2.4 \times 10^{-4}$  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，0.01 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。

b. 使用96孔板测定的计算公式如下：

(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1nmol TNB定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 1760 \times \Delta A \div Cpr$$

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1nmol TNB定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 355.6 \times \Delta A \div W$$

(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1nmol TNB定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.711 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， $2.4 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：TNB 摩尔消光系数， $1.36 \times 10^4$  L/mol/cm；d：96孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 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。