

柠檬酸合酶 (citrate synthase, CS) 试剂盒说明书

微量法 100 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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。

组成：

产品名称	CE010-100T/48S	Storage
试剂一：液体	100ml	-20℃
试剂二：液体	20ml	-20℃
试剂三：液体	1.5ml	-20℃
试剂四：液体	28ml	4℃
试剂五：粉剂	1 瓶	4℃
试剂六：粉剂	1 支	-20℃
说明书	一份	

试剂六：粉剂×1 支，-20℃保存，临用前加入 1.2ml 蒸馏水，用不完的试剂仍-20℃保存；

自备仪器和用品：

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

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 10μl 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）。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线：0518-81263339

官网：<http://www.bio149.com>

- ⑤ 在步骤④的沉淀中加入 200μl 试剂二和 2μl 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 0.6ml 无水乙醇和 13ml 试剂四，混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 5min；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；
 - (2) **测定管**：在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10μl 样本、**220μl 试剂五**和 10μl 试剂六，混匀，37℃反应 15min 后立即测定吸光值 A1。
 - (3) **对照管**：在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10μl 样本、**220μl 试剂四**和 10μl 试剂六，混匀，37℃反应 15min 后立即测定吸光值 A2。
 - (4) 计算 $\Delta A = A1 - A2$ ，每个测定管设一个对照管。

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 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 117.6 \times \Delta A \div Cpr$$

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 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 23.8 \times \Delta A \div W$$

- (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 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min /} 10^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.0475 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 2.4×10^{-4} L； ϵ ：TNB 摩尔消光系数， 1.36×10^4 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，15 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 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 235.3 \times \Delta A \div Cpr$$

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 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 47.5 \times \Delta A \div W$$

- (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。

$$CS \text{ (nmol/min /} 10^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.095 \times \Delta A$$



V 反总: 反应体系总体积, 2.4×10^{-4} L; ϵ : TNB 摩尔消光系数, 1.36×10^4 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, 15 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。

