

柠檬酸合酶 (CS) 检测试剂盒

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

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	CE009-25T/12S	CE009-50T/24S	Storage
试剂一：液体	25ml	50ml	-20°C
试剂二：液体	5ml	10ml	-20°C
试剂三：液体	0.5ml	1ml	-20°C
试剂四：液体	28ml	55ml	4°C
试剂五：粉剂	1 瓶	1 瓶	4°C
试剂六：粉剂	1 支	1 支	-20°C
说明书	一份		

CE009-25T/12S 试剂六：粉剂×1 支，-20°C保存，临用前加入 1.2ml 蒸馏水，用不完的试剂仍-20°C保存；

CE009-50T/24S 试剂六：粉剂×1 支，-20°C保存，临用前加入 2.4ml 蒸馏水，用不完的试剂仍-20°C保存；

自备仪器和用品：

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

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 10 μ l 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- ② 将匀浆 600g，4°C离心 5min。
- ③ 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4°C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



⑤ 在步骤④的沉淀中加入 200 μ l 试剂二和 2 μ l 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 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或 25 $^{\circ}$ C（其它物种）孵育 5min；用不完的试剂分装后-20 $^{\circ}$ C保存，禁止反复冻融；

(2) **测定管**：在 EP 管中加入 40 μ l 样本、**880 μ l 试剂五**和 40 μ l 试剂六，混匀，37 $^{\circ}$ C反应 15min 后立即测定吸光值 A1。

(3) **对照管**：在 EP 管中加入 40 μ l 样本、**880 μ l 试剂四**和 40 μ l 试剂六，混匀，37 $^{\circ}$ C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：

(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。

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

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。

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

(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，9.6 $\times 10^{-4}$ L； ϵ ：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，0.04 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。

