

使用说明书

Instruction Manual

柠檬酸合酶(CS)活性检测试剂盒（分光光度法）

Citrate Synthase Assay Kit (Spectrophotometry)

产品描述

柠檬酸合酶 (Citrate Synthase, CS) (EC 2.3.3.1) 是一种线粒体酶，存在于所有能够氧化代谢的细胞中。它在 Krebs-三羧酸循环中催化草酰乙酸合成柠檬酸。CS 参与能量产生、脂肪生成和胆固醇生成，其活性遵循一个昼夜节律。枸橼酸合成酶活性测定试剂盒用于测量各种组织、细胞培养（粘附或悬浮）和纯化线粒体中 CS 的活性。

检测原理

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，吸光值的变化与酶活性成正比。

产品组成及储存条件

50T/24S 规格的产品组成如下：

组成	规格	储存条件
CB0053S-A	25mL×1 瓶	-20℃保存。
CB0053S-B	5mL×1 瓶	-20℃保存。
CB0053S-C	0.3mL×1 瓶	-20℃保存。
CB0053S-D	90mL×1 瓶	4℃保存。
CB0053S-E	粉剂×2 支	4℃保存；临用前加入 2mL 无水乙醇，剩余试剂仍需 4℃保存一周。
CB0053S-F	粉剂×4 支	-20℃保存，临用前加入 500μL 蒸馏水，剩余试剂仍需-20℃保存。
CB0053S-G	粉剂×2 支	-20℃保存，临用前加入 1.5mL 蒸馏水，剩余试剂仍需-20℃保存。

注：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

操作说明

一、自备用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪和蒸馏水。

二、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：

- 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1mL CB0053S-A 和 10μL CB0053S-C，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 将匀浆 600g，4℃离心 5min。
- 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心 10min。
- 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 200μL CB0053S-B 和 2μL CB0053S-C，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。

三、测定步骤：

- 分光光度计预热30min 以上，调节波长至412nm，蒸馏水调零。

- 将 CB0053S-D, E, F, G 在 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 孵育 5min。
- 在 1mL 玻璃比色皿中加入：

试剂名称	测定管 (μL)	对照管 (μL)
CB0053S-D	860	930
CB0053S-E	35	35
CB0053S-F	35	
样本	35	35
CB0053S-G	35	

将上述试剂按顺序加入 1mL 玻璃比色皿中，加 CB0053S-G 入的同时开始计时，在 412nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A₁，之后迅速将比色皿连同反应液一起放入 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴中准确反应 2 分钟；迅速取出比色皿并擦干，412nm 下记录 2 分 20 秒时的吸光度 A₂，计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。
 计算上清液的测定管 $\Delta A_1 = A_2 - A_1$ ，上清液对照管的 $\Delta A_1' = A_2 - A_1$ ，沉淀的测定管 $\Delta A_2 = A_2 - A_1$ ，沉淀的对照管 $\Delta A_2' = A_2 - A_1$ ，计算 $\Delta A_{\text{上清}} = \Delta A_1 - \Delta A_1'$ ，计算 $\Delta A_{\text{沉淀}} = \Delta A_2 - \Delta A_2'$ 。

四、CS 酶活性计算公式：

A. 组织中 CS 活力的计算：

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。

$$\text{CS 上清 (U/mg prot)} = \Delta A_{\text{上清}} \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr}_{\text{上清}} \times V_{\text{样本}}) \div T \\ = 1050 \times \Delta A_{\text{上清}} \div \text{Cpr}_{\text{上清}}$$

$$\text{CS 沉淀 (U/mg prot)} = \Delta A_{\text{沉淀}} \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (\text{Cpr}_{\text{沉淀}} \times V_{\text{样本}}) \div T \\ = 1050 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div \text{Cpr}_{\text{沉淀}}$$

$$\text{CS (U/mg prot)} = \text{CS}_{\text{上清}} + \text{CS}_{\text{沉淀}} = 1050 \times \Delta A_{\text{上清}} \div \text{Cpr}_{\text{上清}} + 1050 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div \text{Cpr}_{\text{沉淀}}$$

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。

$$\text{CS 上清 (U/g 鲜重)} = \Delta A_{\text{上清}} \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \div T = 1050 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W$$

$$\text{CS 沉淀 (U/g 鲜重)} = \Delta A_{\text{沉淀}} \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{沉淀}}) \div T = 212 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W$$

$$\text{CS (U/g 鲜重)} = \text{CS}_{\text{上清}} + \text{CS}_{\text{沉淀}} = 1050 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W + 212 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W$$

B. 细菌或培养细胞中 CS 活力的计算：

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。

$$\text{CS 上清 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A_{\text{上清}} \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \div T = 2.1 \times \Delta A_{\text{上清}}$$

$$\text{CS 沉淀 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A_{\text{沉淀}} \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{沉淀}}) \div T = 0.4242 \times \Delta A_{\text{沉淀}}$$

$$\text{CS (U/10}^4 \text{ cell)} = \text{CS}_{\text{上清}} + \text{CS}_{\text{沉淀}} = 2.1 \times \Delta A_{\text{上清}} + 0.4242 \times \Delta A_{\text{沉淀}}$$

注： ϵ ：TNB 的消光系数， $13.6 \times 10^3 \text{ mL}/(\text{nmol} \cdot \text{cm})$ ； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，1mL； d ：比色皿光径，1cm； $V_{\text{样本}}$ ：加入的样本体积，0.035mL； $V_{\text{提取}}$ ：提取液体积，1mL； $V_{\text{沉淀}}$ ：溶解沉淀的总体积，0.202mL； T ：反应时间，2min； $\text{Cpr}_{\text{上清}}$ ：上清液的蛋白浓度，mg/mL； $\text{Cpr}_{\text{沉淀}}$ ：沉淀溶解后的蛋白浓度，mg/mL； W ：样本鲜重，g。

■ 注意事项

1. 测定过程中样本和所有试剂在冰上放置，以免变性和失活。
2. 比色皿中反应液的温度必须保持 37℃或 25℃，取小烧杯一只装入一定量的 37℃或 25℃蒸馏，将此烧杯放入 37℃或 25℃水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。
3. 最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。
4. 蛋白定量测定，建议使用 TargetMol 生产的 BCA Protein Quantification Kit (C0050)。
5. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
6. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

