

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。

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：

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28mL×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1.2mL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。

柠檬酸合酶（citrate synthase, CS）试剂盒说明书测定步骤：

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10 μ L样本、**220 μ L试剂四**和10 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 $\Delta A=A_1-A_2$ ，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。

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

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，2.4 $\times 10^{-4}$ 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，0.01 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。

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

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。

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

(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 $\times 10^{-4}$ L； ϵ ：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，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。

