



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

柠檬酸合酶(CS)活性检测试剂盒(分光光度法)

货号: R41959

规格: 50T/24S

有效期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
试剂-A	25mL×1瓶	-20℃保存;
试剂-B	5mL×1瓶	-20℃保存;
试剂-C	0.3mL×1瓶	-20℃保存;
试剂-D	90mL×1瓶	2-8℃保存;
试剂-E	粉剂×2支	2-8℃保存; 临用前加入2mL无水乙醇, 剩余试剂仍需2-8℃保存一周;
试剂-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;
试剂-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;

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

简介

意义: 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。

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。

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。

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-A 和 10uL 试剂-C, 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)。
5. 在步骤 4 中的沉淀中加入 200uL 试剂-B 和 2uL 试剂-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

测定步骤:

1. 分光光度计预热30min 以上, 调节波长至412nm, 蒸馏水调零。
2. 将 试剂-D, E, F, G 在37°C (哺乳动物) 或25°C (其它物种) 孵育5min。
3. 在 1 mL 玻璃比色皿中加入:

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

将上述试剂按顺序加入1 mL玻璃比色皿中, 加试剂-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 $\Delta A = A2 - A1$ 。

计算上清液的测定管 $\Delta A1 = A2 - A1$,上清液对照管的 $\Delta A1' = A2 - A1$,沉淀的测定管 $\Delta A2 = A2 - A1$,沉淀的对照管 $\Delta A2' = A2 - A1$,计算 $\Delta A_{\text{上清}} = \Delta A1 - \Delta A1'$,计算 $\Delta A_{\text{沉淀}} = \Delta A2 - \Delta A2'$ 。

注意: 空白管和标准管只需测定一次。



CS 酶活性计算公式:

一、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。

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

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

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

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。

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

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

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

二、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。

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

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

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



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

ϵ : TNB 的消光系数, $13.6 \times 10^3 \text{ mL}/(\text{nmol} \cdot \text{cm})$; V 反总: 反应体系总体积, 1mL; d: 比色皿光径, 1cm; V 样本: 加入的样本体积, 0.035mL; V 提取: 提取液体积, 1mL; V 沉淀: 溶解沉淀的总体积, 0.202mL; T: 反应时间, 2min; Cpr 上清: 上清液的蛋白浓度, mg/mL; Cpr 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°C 或 25°C, 取小烧杯一只装入一定量的 37°C 或 25°C 蒸馏水, 将此烧杯放入 37°C 或 25°C 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。



源叶