

柠檬酸合酶 (CS) 检测试剂盒说明书

(货号: ADS-F-FM008-09 分光法 9 样)

有效期: 3 个月

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 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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水

试剂组成和配制:

试剂一: 液体 10mL×1 瓶, -20℃ 保存;

试剂二: 液体 2mL×1 瓶, -20℃ 保存;

试剂三: 液体 0.2mL×1 支, -20℃ 保存;

试剂四: 液体 10mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂五: 粉剂×1 支, 4℃ 保存, 临用前加入 320 μL 双蒸水, 用不完的试剂仍 4℃ 保存;

试剂六: 粉剂×1 支, -20℃ 保存, 临用前加入 320 μL 双蒸水, 用不完的试剂仍-20℃ 保存;

试剂七: 粉剂×1 支, -20℃ 保存, 临用前加入 320 μL 双蒸水, 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 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 在沉淀中加入 200uL 试剂二和 2uL 试剂三, 超声波破碎 (功率 20%, 超声 3 秒, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 用于线粒体 CS 测定。

测定步骤:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂四	780
试剂五	30
试剂六	30
样本	30
蒸馏水	

混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 5min

试剂七	30
-----	----

将上述试剂按顺序加入 1 mL 玻璃比色皿中, 加试剂七的同时开始计时, 在 412nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1, 比色后迅速将比色皿连同反应液一起放入 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴中准确反应 2 分钟; 迅速取出比色皿并擦干, 412 nm 下记录 2 分 20 秒时的吸光度 A2, 计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

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℃ 蒸馏水，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。

CS 活性计算:

(1) 按蛋白含量计算

单位的定义：37℃ 或 25℃ 下每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

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

$$= 1102.94 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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：37℃ 或 25℃ 下每 g 组织在反应体系中每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

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

$$= 222.79 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义：37℃ 或 25℃ 下每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

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

$$= 0.4456 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 9×10^{-4} L； ϵ ：TNB 摩尔消光系数， 13.6×10^3 L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.03 mL；V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样品质量；500：细胞或细菌总数，500 万。