

柠檬酸合酶 (citrate synthase, CS) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-FM008 微板法 48 样)

一、产品简介:

柠檬酸合酶 (CS, EC 2.3.3.1) 几乎存在于所有的生物体中, 是细胞内多种代谢途径的关键限速酶及代谢变化的标志酶, 是发生于线粒体中 TCA 循环入口的第一个限速酶, 也与种子萌发和抗逆等有关。

柠檬酸合酶 (CS) 催化乙酰 CoA 和草酰乙酸产生柠檬酰辅酶 A, 进一步水解成柠檬酸和辅酶 A; 最后与显色剂作用生成黄色物质, 该有色物质在 412nm 处有特征吸收峰, 即可得出 CS 酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 16mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	液体 2mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	粉剂 1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加入 0.3mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	粉剂 1 支	4°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加入 0.5mL 蒸馏水溶解备用。
标准品	粉剂 1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水

四、柠檬酸合酶 (CS) 活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm 4°C离心 15min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例提取

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 12000rpm 4°C离心 15min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

③ 液体样本: 澄清的液体直接检测; 若浑浊则离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 412nm。

② 所有试剂解冻至室温 (25°C)

③ 在 96 孔板中依次加入:

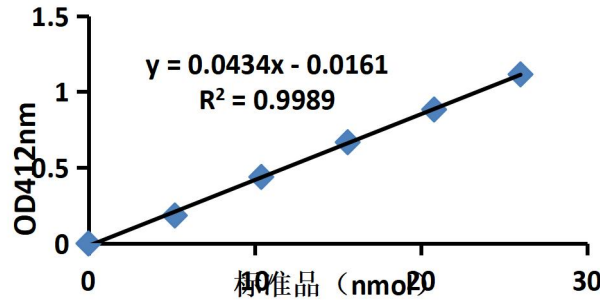
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	150	160
试剂二	20	20
试剂三	5	

试剂四	5	
混匀，30°C条件下反应 15min，立即于 412nm 处读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-A 对照（每个样本做一个自身对照）。		

【注】：若 ΔA 小于 0.01，可以延长反应时间 T（如：60min 或更长），或增加样本量 V1（如 30 μ L，则试剂一相应减少），或增加样本取样质量 W。则调整后的 T 和 V1 和 W 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0434x - 0.0161$ ，x 是标准品摩尔质量：nmol，y 是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1 nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$CS(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0161) \div 0.0434] \div (V1 \times Cpr) \div T = 76.8 \times (\Delta A + 0.0161) \div Cpr$$

3、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$CS(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0161) \div 0.0434] \div (W \times V1 \div V) \div T = 76.8 \times (\Delta A + 0.0161) \div W$$

4、按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1 nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$CS(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0161) \div 0.0434] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.154 \times (\Delta A + 0.0161)$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟催化产生 1 nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$CS(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0161) \div 0.0434] \div V1 \div T = 76.8 \times (\Delta A + 0.0161)$$

V1---加入样本体积，0.02mL； V---加入提取液体积，1mL； T---反应时间，15 min；

W---样本质量，g； 500---细胞或细菌总数，万； CoA---分子量，767.5；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL； 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（2mg/mL）：用前甩几下使粉体落入底部，再加 0.5mL 蒸馏水溶解标准品（母液需在两天内用完且-20°C保存）。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。
- 3 依据测定管加样表操作，20 μ L 标准品+160 μ L 试剂一+20 μ L 试剂二，根据结果即可制作标准曲线。