

柠檬酸合酶 (citrate synthase, CS) 试剂盒说明书

(货号: ADS-W-FM008 微板法 48 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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 避光保存	
试剂三	粉剂 1 支	4°C 保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 0.3mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	粉剂 1 支	-20°C 避光保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 0.5mL 蒸馏水溶解备用; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉剂 1 支	4°C 保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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 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。

③ 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。

2、检测步骤:

- ① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），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：

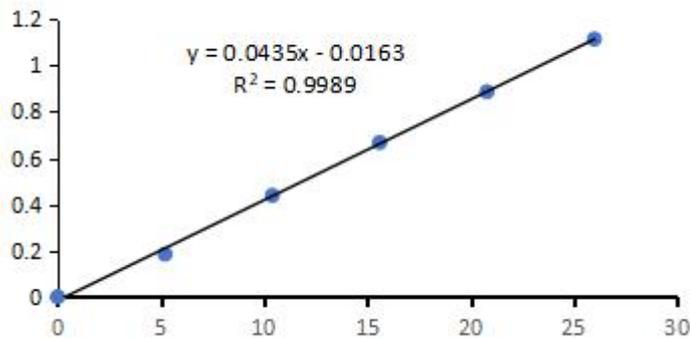
试剂组分 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	150	160
试剂二	20	20
试剂三	5	
试剂四	5	

混匀，30°C条件下反应 15min，立即于 412nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （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 30μL，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： $y = 0.0435x - 0.0163$ ，x 是标准品摩尔质量：nmol，y 是 ΔA 。



- 2、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。

$$CS(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0163) \div 0.0435] \div (W \times V1 \div V) \div T = 76.63 \times (\Delta A + 0.0163) \div W$$

- 3、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。

$$CS(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0163) \div 0.0435] \div (V1 \times Cpr) \div T = 76.63 \times (\Delta A + 0.0163) \div Cpr$$

- 4、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。

$$CS(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0163) \div 0.0435] \div V1 \div T = 76.63 \times (\Delta A + 0.0163)$$

- 5、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。

$$CS(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0163) \div 0.0435] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.1532 \times (\Delta A + 0.0163)$$

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 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。
- 2 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℃保存）
- 3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 4 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 500uL，加入 500uL 蒸馏水，混匀得到 1mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。在 96 孔板中依次加入：

试剂组分 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	20	0
蒸馏水	0	20
试剂一	160	160
试剂二	20	20
混匀，30℃条件下反应 15min，立即于 412nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{标准}} - A_0$ 浓度。		