

柠檬酸合酶（citrate synthase, CS）试剂盒

微量法 100 管/48 样

注 意：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 10μL 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 200μL 试剂二和 2μL 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。

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 10 μ L 样本、220 μ L 试剂五和 10 μ L 试剂六，混匀，37 $^{\circ}$ C 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 $\Delta A=A1-A2$ ，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(nmol/min /mg prot) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \div T = 117.6 \times \Delta A \div Cpr$ 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：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 (nmol/min /g 鲜重) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 23.8 \times \Delta A \div W$ (3)

(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(nmol/min /104 cell) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.0475 \times \Delta A \times V_{\text{反总}}$ 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，2 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(nmol/min /mg prot) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times Cpr) \div T = 235.3 \times \Delta A \div Cpr$ 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：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 (nmol/min /g 鲜重) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 47.5 \times \Delta A \div W$ (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(nmol/min /104 cell) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.095 \times \Delta A \times V_{\text{反总}}$ 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。

