

柠檬酸合酶（citrate synthase, CS）试剂盒说明书

微量法 100管/48样

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：

- 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。
- 将匀浆600g，4℃离心5min。
- 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心10min。
- 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）。
- 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10μL样本、220μL试剂五和10μL试剂六，混匀，37℃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10μL样本、220μL试剂四和10μL试剂六，混匀，37℃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。

$$CS \text{ (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 117.6 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$CS \text{ (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 23.8 \times \Delta A \div W$$

(3) 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。

$$CS \text{ (nmol/min /104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.0475 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积, 2.4×10^{-4} L; ϵ : TNB摩尔消光系数, 1.36×10^4 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, 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。

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。

$$CS \text{ (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 235.3 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$CS \text{ (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 47.5 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$CS \text{ (nmol/min /104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.095 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积, 2.4×10^{-4} L; ϵ : TNB摩尔消光系数, 1.36×10^4 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。