

柠檬酸合酶(CS)活性检测试剂盒说明书

Citrate Synthase Assay Kit

微量法

货号: AK317

规格: 100T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK317-A	50mL×1 瓶	-20℃保存;
AK317-B	10mL×1 瓶	4℃保存;
AK317-C	0.6mL×1 支	-20℃保存;
AK317-D	40mL×1 瓶	4℃保存;
AK317-E	粉剂×2 支	4℃保存; 临用前加入 1mL 双蒸水, 剩余试剂 4℃保存一周;
AK317-F	粉剂×2 支	-20℃保存; 临用前加入 500μL 蒸馏水, 剩余试剂须-20℃保存;
AK317-G	粉剂×1 支	-20℃保存, 临用前加入 1.5mL 蒸馏水, 剩余试剂须-20℃保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 柠檬酸合酶 (Citrate Synthase, CS) (EC 2.3.3.1) 是一种线粒体酶, 存在于所有能够氧化代谢的细胞中。它在 Krebs-三羧酸循环中催化草酰乙酸合成柠檬酸。CS 参与能量产生、脂肪生成和胆固醇生成, 其活性遵循一个昼夜节律。枸橼酸合成酶活性测定试剂盒用于测量各种组织、细胞培养(粘附或悬浮)和纯化线粒体中 CS 的活性。

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, 吸光值的变化与酶活性成正比。

自备用品:

恒温水浴锅、可见分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿/96 孔板和蒸馏水、低温离心机、水浴锅、可调节移液器。

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 AK317-A 和 10μL AK317-C, 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中的沉淀中加入 200μL AK317-B 和 2μL AK317-C, 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。
6. 柠檬酸合酶酶活即沉淀和上清液中的酶活之和。

测定步骤:

1. 分光光度计/酶标仪预热 30min, 调节波长到 412nm, 蒸馏水调零。
2. 将 AK317-D、AK317-E、AK317-F、AK317-G 在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 孵育 5 min

3. 在微量石英比色皿/96 孔板中依次加入

试剂名称	测定管 (μL)	对照管
AK317-D	172	186
AK317-E	7	7
AK317-F	7	
样本	7	7
AK317-G	7	

加试剂六的同时开始计时,记录 412nm 波长下 10 秒时的初始吸光度 A1,之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(96 孔板放入恒温箱中);迅速取出比色皿并擦干,412 nm 下记录 2 分 10 秒时的吸光度 A2,上清液、沉淀的测定管、对照管均需测量(每个样本需测 4 管)。

计算上清液的测定管 $\Delta A1=A2-A1$,上清液对照管的 $\Delta A1'=A2-A1$,沉淀的测定管 $\Delta A2=A2-A1$,沉淀的对照管 $\Delta A2'=A2-A1$,计算 ΔA 上清= $\Delta A1-\Delta A1'$,计算 ΔA 沉淀= $\Delta A2-\Delta A2'$ 。

注意:对照管和空白管只测 1-2 次。

CS 酶活性计算公式:

一、按微量玻璃比色皿计算:

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 上清 (U/mg prot) = ΔA 上清 $\div (\epsilon \times d) \times V$ 反总 $\div (Cpr$ 上清 $\times V$ 样本 $\div T$

= $1050 \times \Delta A$ 上清 $\div Cpr$ 上清

CS 沉淀 (U/mg prot) = ΔA 沉淀 $\div (\epsilon \times d) \times V$ 反总 $\div (Cpr$ 沉淀 $\times V$ 样本 $\div T$

= $1050 \times \Delta A$ 沉淀 $\div Cpr$ 沉淀

CS (U/mg prot) = CS 上清 + CS 沉淀 = $1050 \times \Delta A$ 上清 $\div Cpr$ 上清 + $1050 \times \Delta A$ 沉淀 $\div Cpr$ 沉淀

※ 蛋白定量检测建议使用本公司:BCA Protein Assay Kit (C05-02001)

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 上清 (U/g 鲜重) = ΔA 上清 $\div (\epsilon \times d) \times V$ 反总 $\div (W \times V$ 样本 $\div V$ 提取 $\div T$ = $1061 \times \Delta A$ 上清

$\div W$ CS 沉淀 (U/g 鲜重) = ΔA 沉淀 $\div (\epsilon \times d) \times V$ 反总 $\div (W \times V$ 样本 $\div V$ 沉淀 $\div T$ = $212 \times \Delta A$ 沉淀

$\div W$ CS (U/g 鲜重) = CS 上清 + CS 沉淀 = $1061 \times \Delta A$ 上清 $\div W$ + $212 \times \Delta A$ 沉淀 $\div W$ 。

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 上清 (U/ 10^4 cell) = ΔA 上清 $\div (\epsilon \times d) \times V$ 反总 $\div (500 \times V$ 样本 $\div V$ 提取 $\div T$ = $2.1 \times \Delta A$ 上清

CS 沉淀 (U/ 10^4 cell) = ΔA 沉淀 $\div (\epsilon \times d) \times V$ 反总 $\div (500 \times V$ 样本 $\div V$ 沉淀 $\div T$ = $0.42 \times \Delta A$ 沉淀

CS (U/ 10^4 cell) = CS 上清 + CS 沉淀 = $2.1 \times \Delta A$ 上清 + $0.42 \times \Delta A$ 沉淀。

注: ϵ : TNB 的消光系数, $13.6 \times 10^{-3} \text{ mL}/(\text{nmol} \cdot \text{cm})$; V 反总:反应体系总体积, 0.2 mL; d : 比色皿光径, 1cm; V 样本:加入的样本体积, 0.007mL; V 提取:提取液体积, 1.01mL; V 沉淀:溶解沉淀的总体积, 0.202mL; T :反应时间, 2min; Cpr 上清:上清液的蛋白浓度, mg/mL; Cpr 沉淀:第 3 页 共 4 页 沉淀溶解后的蛋白浓度, mg/mL; W :样本鲜重, g; 500:细胞数量/细菌, 500 万。

二、按 96 孔板计算:

将上述公式中的 $d=1\text{cm}$ 改为 $d=0.5\text{cm}$ (96 孔板光径) 进行计算即可。