



柠檬酸合酶检测试剂盒

Citrate synthase Assay Kit

分光光度法

产品编号: AK376V

产品规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK376-A	50mL×1 瓶	-20℃保存;
AK376-B	10mL×1 瓶	-20℃保存;
AK376-C	1mL×1 支	-20℃保存;
AK376-D	55mL×1 瓶	4℃保存;
AK376-E	粉剂×1 瓶	4℃保存;
AK376-F	粉剂×1 支	-20℃保存, 临用前加入 2.4mL 蒸馏水, 剩余试剂仍-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) 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。

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。

自备用品:

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰、无水乙醇和蒸馏水。

样本前处理:

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 AK376-A 和 10uL AK376-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的沉淀中加入 200uL AK376-B 和 2uL AK376-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。

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 AK376-E 中加入 1.2mL 无水乙醇和 26mL AK376-D, 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) 操作表

试剂名称	测定管 (μL)	对照管 (μL)
样本	40	40
AK376-D		880μL
AK376-E	880μL	
AK376-F	40μL	40μL

混匀，37℃反应 15min 后立即测定吸光值 A2。

计算 $\Delta A = A1 - A2$ ，每个测定管设一个对照管。

CS 活性计算：

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。

$$CS (U/mg \text{ prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 117.6 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

※ 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。

$$CS (U/g \text{ 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 23.8 \times \Delta A \div W$$

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。

$$CS (U/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.0475 \times \Delta A$$

注：V 反总：反应体系总体积， 9.6×10^{-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，0.04 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。