



## 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：

- 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。
- 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 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：

- 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。
- 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。

$$CS \text{ (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 117.6 \times \Delta A \div Cpr$$

※ 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。

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

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。

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

注：V 反总：反应体系总体积， $9.6 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：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，0.04 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。