

柠檬酸合酶 (citrate synthase, CS) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/24 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、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。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 50mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂二：液体 10mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂三：液体 1mL×1 支，-20℃保存；

试剂四：液体 55mL×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 2.4mL 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 10uL 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 200uL 试剂二和 2uL 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 1.2mL 无水乙醇和 26mL 试剂四, 混匀, 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 孵育 5min; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融;

(2) 测定管: 在 EP 管中加入 40μL 样本、880μL 试剂五和 40μL 试剂六, 混匀, 37°C 反应 15min 后立即测定吸光值 A1。

(3) 对照管: 在 EP 管中加入 40μL 样本、880μL 试剂四和 40μL 试剂六, 混匀, 37°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:

(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) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 117.6 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$ 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 (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 (nmol/min / 10^4 cell) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.0475 \times \Delta A$
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, 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

Lifemall.asia

To be with you