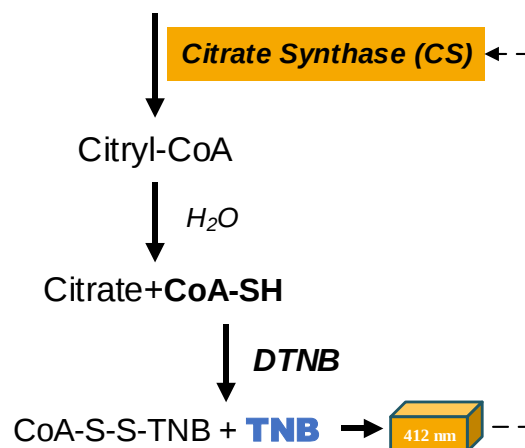




柠檬酸合酶 (CS) 活性检测试剂盒
Citrate Synthase (CS) Activity Assay Kit

Oxaloacetate + Acetyl CoA



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



柠檬酸合酶（CS）活性检测试剂盒

Citrate Synthase (CS) Activity Assay Kit

一、产品描述

柠檬酸合酶（CS）广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞的线粒体基质中，是细胞内多种代谢途径的关键限速酶及代谢变化的标志酶，具有高度底物特异性，仅催化乙酰 CoA 和草酰乙酸缩合生成柠檬酸和辅酶 A，作为三羧酸循环第一个限速酶，是该途径主要调控位点之一。

柠檬酸合酶催化乙酰 CoA 和草酰乙酸生成柠檬酰辅酶 A，进一步水解生成柠檬酸，过程中 DTNB 转变为黄色的 TNB，产物在 412 nm 处具有特征吸收峰，根据吸光值变化即可表征柠檬酸合酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 50 mL×1 瓶	-20°C 保存	-
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	液体 0.6 mL×1 支	-20°C 保存	-
试剂三	液体 40 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂四	液体 2 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂五	粉剂×2 支	-20°C 保存	使用前每支加入 500 μ L 蒸馏水充分溶解 (配置后未使用试剂-20°C 保存)
试剂六	粉剂×1 支	-20°C 保存	使用前每支加入 1.5 mL 蒸馏水充分溶解 (配置后未使用试剂-20°C 保存)

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿（光径 10 mm）/96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 样品处理（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①称取 0.1 g 组织或收集 500 万细胞，加入 1 mL 提取液和 10 μ L 试剂二，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，匀浆液 4°C 600 g 离心 5 min，取上清转移至另一离心管中，4°C 12000 g 离心 10 min；

②步骤①离心后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）；

③步骤①离心后沉淀中加入 200 μ L 试剂一和 2 μ L 试剂二，反复吹打充分混匀即为待测样本，用于线粒体 CS 活性测定（可用于测定蛋白含量）。

2.测定步骤

- ①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 412 nm，蒸馏水调零。
- ②使用前将试剂三置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）预热 10 min。
- ③在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	对照组 (μL)
试剂三	172	186
试剂四	7	7
试剂五	7	-
待测样本	7	7
试剂六	7	-

吸光值测定：①加入试剂六的同时开始计时，测定 10 s（总时间）时 412 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 对照；②37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）准确反应 120 s，测定 130 s（总时间）时 412 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 对照；③计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A2_{\text{测定}} - A1_{\text{测定}}$ ， $\Delta A_{\text{对照}} = A2_{\text{对照}} - A1_{\text{对照}}$ ， $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{对照}}$ 。

3.柠檬酸合酶（CS）活性计算

3.1 使用 96 孔板测定的计算公式

单位定义：37°C 或 25°C 下每 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。

$$\text{CS (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}}}{\epsilon \times d_1 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{2100 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

注释： V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.007 mL；V 反总：反应体系总体积，0.2 mL； ϵ ：TNB 摩尔消光系数， $13.6 \times 10^3 \text{ mL/nmol/cm}$ ； d_1 ：96 孔板光径，0.5 cm；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL。

3.2 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

单位定义：37°C 或 25°C 下每 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。

$$\text{CS (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}}}{\epsilon \times d_2 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1050 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

注释： V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.007 mL；V 反总：反应体系总体积，0.2 mL； ϵ ：TNB 摩尔消光系数， $13.6 \times 10^3 \text{ mL/nmol/cm}$ ； d_2 ：微量玻璃比色皿光径，1 cm；T：反应时间，2 min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL。

四、注意事项

- ①测定过程中待测样本和所有试剂须冰上放置，以免变性和失活；
- ②准确在 10 s 和 130 s 处完成读数，以保证实验结果的准确性；
- ③若使用 96 孔板测定，须使用多道移液器且分批进行测定，以确保组间反应时间一致，不推荐同时测多个样本；也可根据样本数量配制测定组工作液（试剂三、四、五、六）和对照组工作液（试剂三、四）后再进行测定；
- ④为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系；
- ⑤推荐使用样本蛋白浓度计算酶活，若用样本质量计算，则需加测胞浆提取物 CS 活性，上清（胞浆提取物）和沉淀（线粒体）酶活之和即为总酶活。

附：使用样本质量计算的公式

3.1 使用 96 孔板测定的计算公式

单位定义：37℃或 25℃下每 g 组织每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CS 上清 (U/g)} = \frac{\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}}}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{2122 \times \Delta A1}{W}$$

$$\text{CS 沉淀 (U/g)} = \frac{\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}}}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{424 \times \Delta A2}{W}$$

$$\text{CS (U/g)} = \text{CS 上清} + \text{CS 沉淀} = \frac{2122 \times \Delta A1}{W} + \frac{424 \times \Delta A2}{W}$$

3.2 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

单位定义：37℃或 25℃下每 g 组织每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CS 上清 (U/g)} = \frac{\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}}}{\epsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1061 \times \Delta A1}{W}$$

$$\text{CS 沉淀 (U/g)} = \frac{\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}}}{\epsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{212 \times \Delta A2}{W}$$

$$\text{CS (U/g)} = \text{CS 上清} + \text{CS 沉淀} = \frac{1061 \times \Delta A1}{W} + \frac{212 \times \Delta A2}{W}$$

注释： V 反总：反应体系总体积，0.2 mL；V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.007 mL；V 提：提取液体积，1.01 mL；V 样总：溶解沉淀的总体积，0.202 mL；ε：TNB 摩尔消光系数，13.6×10³ mL/nmol/cm；d₁：96 孔板光径，0.5 cm；d₂：比色皿光径，1 cm；T：反应时间，2 min；W：样本质量，g；ΔA1：上清测定值；ΔA2：沉淀测定值。

