

柠檬酸合酶（citrate synthase, CS）试剂盒

微量法 100 管/48 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/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰、无水乙醇和蒸馏水

试剂组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂二：液体 20mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂三：液体 1.5mL×1 支，-20℃保存；

试剂四：液体 28mL×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 1.2mL 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 0.6mL 无水乙醇和 13mL 试剂四, 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) 测定管: 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μL 样本、220 μL 试剂五和 10 μL 试剂六, 混匀, 37℃反应 15min 后立即测定吸光值 A1。

(3) 对照管: 在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μL 样本、220 μL 试剂四和 10 μL 试剂六, 混匀, 37℃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:

a.使用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

(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。

$$CS \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 23.8 \times \Delta A \div W$$

(3)

(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/10⁴ cell) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.0475 \times \Delta A \times V \text{ 反总}$ 反应体系总体积, 2.4 × 10⁻⁴ L; ϵ : TNB 摩尔消光系数, 1.36 × 10⁴ L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 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 万。

b.使用 96 孔板测定的计算公式如下:

(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) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 235.3 \times \Delta A \div Cpr$

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。

$$CS \text{ (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 47.5 \times \Delta A \div W$$

(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/10⁴ cell) = $[\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.095 \times \Delta A \times V \text{ 反总}$ 反应体系总体积, 2.4 × 10⁻⁴ L; ϵ : TNB 摩尔消光系数, 1.36 × 10⁴ L/mol/cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 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。

