

## 柠檬酸合酶（citrate synthase, CS）试剂盒说明书

（分光法 24 样）

### 一、产品简介：

柠檬酸合酶（CS, EC 2.3.3.1）几乎存在于所有的生物体中，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，是发生于线粒体中 TCA 循环入口的第一个限速酶，也与种子萌发和抗逆等有关。

柠檬酸合酶（CS）催化乙酰 CoA 和草酰乙酸产生柠檬酰辅酶 A，进一步水解成柠檬酸；进一步与显色剂作用生成黄色物质，该有色物质在 412nm 处有特征吸收峰，即可得出 CS 酶活性大小。

### 二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 32mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 4mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，再加入 0.55mL 蒸馏水溶解备用。
试剂四	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，再加入 0.7mL 蒸馏水溶解备用。
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

### 三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水

### 四、柠檬酸合酶（CS）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

##### ① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃离心 15min，取上清，置冰上待测。

**【注】：**若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例提取

##### ② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 15min，取上清，置冰上待测。

**【注】：**若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10<sup>4</sup>）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

##### ③ 液体样本：澄清的液体直接检测；若浑浊则离心后取上清检测。

#### 2、上机检测：

① 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 412nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）

③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

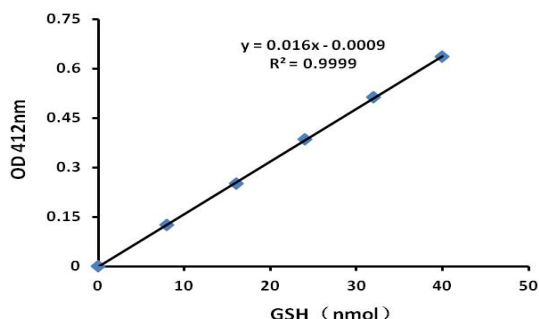
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	80	80
试剂一	600	640
试剂二	80	80
试剂三	20	
试剂四	20	

混匀，30°C条件下反应 15min，立即于 412nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ （每个样本做一个自身对照）。

**【注】**：若 $\Delta A$  过小，可以延长反应时间 T（如：60min 或更长），或增加样本量 V1（如 120μL，则试剂一相应减少）。或增加样本取样质量 W。则调整后的 T 和 V1 和 W 需代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.016x - 0.0009$ ，x 是标准品摩尔质量：nmol，y 是 $\Delta A$ 。



2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1 nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$CS(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [(\Delta A + 0.0009) \div 0.016] \div (V1 \times Cpr) \div T = 52.08 \times (\Delta A + 0.0009) \div Cpr$$

3、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$CS(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0009) \div 0.016] \div (W \times V1 \div V) \div T = 52.08 \times (\Delta A + 0.0009) \div W$$

4、按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1 nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$CS(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0009) \div 0.016] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.104 \times (\Delta A + 0.0009)$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟催化产生 1 nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$CS(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0009) \div 0.016] \div V1 \div T = 52.08 \times (\Delta A + 0.0009)$$

V1---加入样本体积，0.08mL； V---加入提取液体积，1mL； T---反应时间，15 min；

W---样本质量，g； 500---细胞或细菌总数，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL； 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（10μmol/mL）：用前甩几下使粉体落入底部，再加 2mL 蒸馏水溶解标准品（母液需在两天内用完且-20°C保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. μmol/mL。
- 3 依据测定管加样表操作，80μL 标准品+640μL 试剂一+80μL 试剂二，根据结果即可制作标准曲线。