

柠檬酸合酶(CS)活性检测试剂盒说明书

Citrate Synthase Assay Kit

分光光度法

货号: AK316

规格: 50T/24S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK316-A	25mL×1 瓶	-20℃保存;
AK316-B	5mL×1 瓶	-20℃保存;
AK316-C	0.3mL×1 瓶	-20℃保存;
AK316-D	90mL×1 瓶	4℃保存;
AK316-E	粉剂×2 支	4℃保存; 临用前加入 2mL 无水乙醇, 剩余试剂仍需 4℃保存一周;
AK316-F	粉剂×4 支	-20℃保存, 临用前加入 500μL 蒸馏水, 剩余试剂仍需-20℃保存;
AK316-G	粉剂×2 支	-20℃保存, 临用前加入 1.5mL 蒸馏水, 剩余试剂仍需-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) 是一种线粒体酶, 存在于所有能够氧化代谢的细胞中。它在 Krebs-三羧酸循环中催化草酰乙酸合成柠檬酸。CS 参与能量产生、脂肪生成和胆固醇生成, 其活性遵循一个昼夜节律。枸橼酸合成酶活性测定试剂盒用于测量各种组织、细胞培养(粘附或悬浮)和纯化线粒体中 CS 的活性。

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, 吸光值的变化与酶活性成正比。

自备用品:

可见分光光度计、1ml 玻璃比色皿、低温离心机、水浴锅、可调式移液枪和蒸馏水。

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 AK316-A 和 10uL AK316-C, 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 中的沉淀中加入 200uL AK316-B 和 2uL AK316-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

1. 分光光度计预热30min 以上, 调节波长至412nm, 蒸馏水调零。
2. 将 AK316-D, E, F, G 在37℃ (哺乳动物) 或25℃ (其它物种) 孵育5min。

3. 在 1 mL 玻璃比色皿中加入

试剂名称	测定管 (μL)	对照管 (μL)
AK316-D	860	930
AK316-E	35	35
AK316-F	35	
样本	35	35
AK316-G	35	

将上述试剂按顺序加入 1 mL 玻璃比色皿中，加 AK316-G 入的同时开始计时，在 412nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1，之后迅速将比色皿连同反应液一起放入 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴中准确反应 2 分钟；迅速取出比色皿并擦干，412nm 下记录 2 分 20 秒时的吸光度 A2，计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

计算上清液的测定管 $\Delta A1=A2-A1$ ，上清液对照管的 $\Delta A1'=A2-A1$ ，沉淀的测定管 $\Delta A2=A2-A1$ ，沉淀的对照管 $\Delta A2'=A2-A1$ ，计算 ΔA 上清= $\Delta A1-\Delta A1'$ ，计算 ΔA 沉淀= $\Delta A2-\Delta A2'$ 。

CS 酶活性计算公式：

一、组织中 CS 活力的计算：

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。

$$\text{CS 上清 (U/mg prot)} = \Delta A \text{ 上清} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反应} \div (\text{Cpr 上清} \times V \text{ 样本}) \div T$$

$$= 1050 \times \Delta A \text{ 上清} \div \text{Cpr 上清}$$

$$\text{CS 沉淀 (U/mg prot)} = \Delta A \text{ 沉淀} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反应} \div (\text{Cpr 沉淀} \times V \text{ 样本}) \div T$$

$$= 1050 \times \Delta A \text{ 沉淀} \div \text{Cpr 沉淀}$$

$$\text{CS (U/mg prot)} = \text{CS 上清} + \text{CS 沉淀} = 1050 \times \Delta A \text{ 上清} \div \text{Cpr 上清} + 1050 \times \Delta A \text{ 沉淀} \div \text{Cpr 沉淀}$$

※ 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。

$$\text{CS 上清 (U/g 鲜重)} = \Delta A \text{ 上清} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反应} \div (W \times V \text{ 样本} \div V \text{ 提取}) \div T = 1050 \times \Delta A \text{ 上清} \div W$$

$$\text{CS 沉淀 (U/g 鲜重)} = \Delta A \text{ 沉淀} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反应} \div (W \times V \text{ 样本} \div V \text{ 沉淀}) \div T = 212 \times \Delta A \text{ 沉淀} \div W$$

$$\text{CS (U/g 鲜重)} = \text{CS 上清} + \text{CS 沉淀} = 1050 \times \Delta A \text{ 上清} \div W + 212 \times \Delta A \text{ 沉淀} \div W。$$

二、细菌或培养细胞中 CS 活力的计算：

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。

$$\text{CS 上清 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \text{ 上清} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反应} \div (500 \times V \text{ 样本} \div V \text{ 提取}) \div T = 2.1 \times \Delta A \text{ 上清}$$

$$\text{CS 沉淀 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \text{ 沉淀} \div \epsilon \div d \times V \text{ 反应} \div (500 \times V \text{ 样本} \div V \text{ 沉淀}) \div T = 0.4242 \times \Delta A \text{ 沉淀}$$

$$\text{CS (U/10}^4 \text{ cell)} = \text{CS 上清} + \text{CS 沉淀} = 2.1 \times \Delta A \text{ 上清} + 0.4242 \times \Delta A \text{ 沉淀}。$$

ϵ : TNB 的消光系数, $13.6 \times 10^{-3} \text{ mL}/(\text{nmol} \cdot \text{cm})$; V 反应: 反应体系总体积, 1mL; d: 比色皿光径, 1cm; V 样本: 加入的样本体积, 0.035mL; V 提取: 提取液体积, 1mL; V 沉淀: 溶解沉淀的总体积, 0.202mL; T: 反应时间, 2min; Cpr 上清: 上清液的蛋白浓度, mg/mL; Cpr 沉淀: 沉淀溶解后的蛋白浓度, mg/mL; W: 样本鲜重, g。

注意事项：

1. 测定过程中样本和所有试剂在冰上放置，以免变性和失活。

2. 比色皿中反应液的温度必须保持 37℃或 25℃，取小烧杯一只装入一定量的 37℃或 25℃蒸馏水，将此烧杯放入 37℃或 25℃水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。
3. 最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。