

柠檬酸合酶（CS）活性检测试剂盒（可见分光光度法）

产品货号：BA1240

产品规格：10管/5样、25管/12样、50管/24样

产品简介：

CS（EC2.3.3.1）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。

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DTNB转变成黄色的TNB，在412nm处有特征吸光值。

注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。

产品组成：

试剂名称/规格	10T	25T	50T	保存条件
提取液	液体5mL×1瓶	液体15mL×1瓶	液体25mL×1瓶	-20℃
试剂一	液体2.5mL×1瓶	液体2.5mL×1瓶	液体5mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体0.1mL×1支	液体0.2mL×1支	液体0.3mL×1支	-20℃
试剂三	液体25mL×1瓶	液体45mL×1瓶	液体90mL×1瓶	2-8℃
试剂四	液体1mL×1支	液体2mL×1瓶	液体4mL×1瓶	2-8℃
试剂五	粉剂×1支	粉剂×2支	粉剂×4支	-20℃
试剂六	粉剂×1支	粉剂×1支	粉剂×2支	-20℃

溶液的配制：

1. 试剂五：临用前加入500μL双蒸水，用不完的试剂仍-20℃保存；
2. 试剂六：临用前加入1.5mL双蒸水，用不完的试剂仍-20℃保存。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计、低温离心机、水浴锅、研钵/匀浆器、可调节移液器、1mL玻璃比色皿和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 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提取液和10μL试剂二，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
 - 2) 将匀浆液600g，4℃离心5min。将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心10min。
 - 3) 上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的CS。
 - 4) 在沉淀中加入200μL试剂一和2μL试剂二，反复吹打充分混匀，用于CS测定，并用于蛋白浓度测定。

二、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. 试剂三置于25℃（一般物种）或者37℃（哺乳动物）水浴中预热10min左右（保证无沉淀）。
3. 操作表：在1mL玻璃比色皿中分别加入

试剂名称（μL）	测定管	对照管
试剂三	860	930
试剂四	35	35



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

试剂五	35	-
样本	35	35
试剂六	35	-

将上述试剂按顺序加入1mL玻璃比色皿中，加试剂六的同时开始计时，记录412nm波长下10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°C（哺乳动物）或25°C（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10秒时的吸光度A2，并计算测定管的 $\Delta A1 = A2 - A1$ ，对照管的 $\Delta A1' = A2' - A1'$ ， $\Delta A = \Delta A1 - \Delta A1'$ 。

三、CS活性计算

按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：37°C或25°C下每mg组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生1nmol TNB定义为一个酶活力单位。

$$CS (U/mg \text{ prot}) = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 1050 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

ϵ : TNB的消光系数， $13.6 \times 10^{-3} \text{ mL}/(\text{nmol} \cdot \text{cm})$ ； $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积，1mL； d : 比色皿光径，1cm； $V_{\text{样本}}$: 加入的样本体积，0.035mL； T : 反应时间，2min； C_{pr} : 样本蛋白浓度，mg/mL。

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°C或25°C，取小烧杯一只装入一定量的37°C或25°C蒸馏水，将此烧杯放入37°C或25°C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。
4. 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酶活，上清和沉淀酶活之和方为总酶活。
5. 附：使用样本鲜重计算公式

单位的定义：37°C或25°C下每g组织在反应体系中每分钟催化产生1nmol TNB定义为一个酶活力单位。

$$CS_{\text{上清}} (U/g \text{ 质量}) = \Delta A_{\text{上清}} \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{提取}}) \div T = 1061 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W$$

$$CS_{\text{沉淀}} (U/g \text{ 质量}) = \Delta A_{\text{沉淀}} \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样本}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 212 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W$$

$$CS (U/g \text{ 质量}) = CS_{\text{上清}} + CS_{\text{沉淀}} = 1061 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W + 212 \times \Delta A_{\text{测定}} \div W$$

$\Delta A_{\text{上清}}$: 上清测定值； $\Delta A_{\text{沉淀}}$: 沉淀测定值； ϵ : TNB的消光系数， $13.6 \times 10^{-3} \text{ mL}/(\text{nmol} \cdot \text{cm})$ ； $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积，1mL； d : 比色皿光径，1cm； $V_{\text{样本}}$: 加入的样本体积，0.035mL； $V_{\text{提取}}$: 提取液体积，1.01mL； $V_{\text{样总}}$: 溶解沉淀的总体积，0.202mL； T : 反应时间，2min； W : 样本质量，g。

实验实例：

取0.1g小鼠心脏样本加入1mL提取液和10 μ L试剂二进行匀浆研磨，取上清后再离心，取上清，取沉淀后加入200 μ L试剂一和2 μ L试剂二，之后按照测定步骤操作，用1mL玻璃比色皿测吸光度后计算上清中：

$$\Delta A1 = A2 - A1 = 1.213 - 0.7 = 0.513, \Delta A1' = A2' - A1' = 0, \Delta A_{\text{上清}} = \Delta A1 - \Delta A1' = 0.513;$$

$$\text{沉淀中: } \Delta A1 = A2 - A1 = 0.447 - 0.133 = 0.314, \Delta A1' = A2' - A1' = 0, \Delta A_{\text{沉淀}} = \Delta A1 - \Delta A1' = 0.314, \text{按样本质量计算酶活得:}$$

$$CS(U/g \text{ 质量}) = CS_{\text{上清}} + CS_{\text{沉淀}} = 1061 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W + 212 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W$$

$$= 1061 \times 0.513 \div 0.1 + 212 \times 0.314 \div 0.1 = 6108.7 U/g \text{ 质量}。$$



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com