# 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℃ |

10T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℃（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10秒时的吸光度A2，并计算测定管的ΔA1=A2-A1，对照管的ΔA1'=A2-A1，ΔA=ΔA1-ΔA1'。

**三、CS活性计算**

按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：37℃或25℃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 prot）=ΔA÷（ε×d）×V反总÷（Cpr×V样本）÷T=1050×ΔA÷Cpr

ε：TNB的消光系数，$13.6\times10^{-3}$mL/(nmol·cm)；V反总：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；T：反应时间，2min；Cpr：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℃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。
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℃或25℃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上清（U/g质量）=ΔA上清÷ε÷d×V反总÷（W×V样本÷V提取）÷T=1061×ΔA上清÷W

   CS沉淀（U/g质量）=ΔA沉淀÷ε÷d×V反总÷（W×V样本÷V样总）÷T=212×ΔA沉淀÷W

   CS（U/g质量）=CS上清+CS沉淀=1061×ΔA上清÷W+212×ΔA测定÷W

   ΔA上清：上清测定值；ΔA沉淀：沉淀测定值；ε：TNB的消光系数，$13.6\times10^{-3}$mL/(nmol·cm)；V反总：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，1.01mL；V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10μL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200μL试剂一和2μL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：

ΔA1=A2-A1=1.213-0.7=0.513，ΔA1'=A2'-A1'=0，ΔA上清=ΔA1-ΔA1'=0.513；

沉淀中：ΔA1=A2-A1=0.447-0.133=0.314，ΔA1'=A2'-A1'=0，ΔA沉淀=ΔA1-ΔA1'=0.314，按样本质量计算酶活得：

CS(U/g质量)=CS上清+CS沉淀=1061×ΔA上清÷W+212×ΔA沉淀÷W

=1061×0.513÷0.1+212×0.314÷0.1=6108.7U/g 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