

柠檬酸合酶（CS）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC1065

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 50 mL×1 瓶	-20℃保存
试剂一	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 0.6 mL×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 40 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂四	液体 2mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂五	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂六	粉剂×1 支	-20℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂五：临用前加入 500 μ L 蒸馏水，用不完的试剂仍-20℃保存；
- 2、试剂六：临用前加入 1.5 mL 蒸馏水，用不完的试剂仍-20℃保存。

产品说明：

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。

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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、研钵/匀浆器、可调节移液器、微量玻璃比色皿/96孔板和蒸馏水。

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10 μ L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200 μ L试剂一和2 μ L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/酶标仪预热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：在微量玻璃比色皿/96孔板中分别加入

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
试剂三	172	186
试剂四	7	7
试剂五	7	-
样本	7	7
试剂六	7	-

将上述试剂按顺序加入微量玻璃比色皿/96孔板中，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（96孔板放入恒温箱中）；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

A、按微量玻璃比色皿计算：

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

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, 0.2mL; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样本}}$: 加入的样本体积, 0.007mL; T : 反应时间, 2min; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL。

B、按96孔板计算：

将上述公式中的 $d=1\text{cm}$ 改为 $d=0.6\text{cm}$ （96孔板光径）进行计算即可。

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、用 96 孔板测定时，根据测定管数量配制测定管工作液（试剂三、四、五、六）和对照管工作液（试剂三、四），因通过单位时间内吸光值变化计算酶活，不推荐同时测多个样本。
- 5、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为总酶活。
- 6、附：使用样本鲜重计算公式：

A、按微量玻璃比色皿计算

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1 nmol TNB定义为一个酶活力单位。

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

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

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

$\Delta A_{\text{上清}}$: 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, 0.2 mL; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样本}}$: 加入的样本体积, 0.007mL; $V_{\text{提取}}$: 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。

B、按96孔板计算



将上述公式中的 $d=1\text{cm}$ 改为 $d=0.6\text{cm}$ （96孔板光径）进行计算即可。

实验实例：

1、取 0.1g 小鼠心脏样本加入 1mL 提取液和 10 μL 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 μL 试剂一和 2 μL 试剂二，之后按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测吸光度后计算上清中： $\Delta A_1=A_2-A_1=1.4577-0.8015=0.6562$ ， $\Delta A_1'=A_2'-A_1'=0.7842-0.7331=0.0511$ ， $\Delta A_{\text{上清}}=\Delta A_1-\Delta A_1'=0.6051$ ；沉淀中： $\Delta A_1=A_2-A_1=0.4166-0.1303=0.2863$ ， $\Delta A_1'=A_2'-A_1'=0$ ， $\Delta A_{\text{沉淀}}=\Delta A_1-\Delta A_1'=0.2863$ ，按样本质量计算酶活得：CS
(U/g 质量) = CS 上清+CS 沉淀=1061 $\times\Delta A_{\text{上清}}\div W+212\times\Delta A_{\text{沉淀}}\div W$
= 1061 $\times 0.6051\div 0.1+212\times 0.2863\div 0.1=7027.067$ U/g 质量。

相关发表文献：

- [1] Jiang S, Quan W, Luo J, Lou A, Zhou X, Li F, Shen QW. Low-protein diets supplemented with glycine improves pig growth performance and meat quality: An untargeted metabolomic analysis. *Front Vet Sci.* 2023 Apr 18; 10:1170573. doi: 10.3389/fvets.2023.1170573. PMID: 37143503; PMCID: PMC10153625.
- [2] Sun Y, Zang Y, Chen J, Shang S, Wang J, Liu Q, Tang X. The differing responses of central carbon cycle metabolism in male and female *Sargassum thunbergii* to ultraviolet-B radiation. *Front Plant Sci.* 2022 Oct 3;13:904943. doi: 10.3389/fpls.2022.904943. PMID: 36262652; PMCID: PMC9574197.
- [3] Chen H, Li Y, Gao J, Cheng Q, Liu L, Cai R. Activation of Pdk1 Results in Reduced Protein Aggregation in Diverse Neurodegenerative Conditions. *Mol Neurobiol.* 2023 Sep;60(9):5090-5101. doi: 10.1007/s12035-023-03389-6. Epub 2023 May 30. PMID: 37249790.
- [4] Wu J, Wang L, Zhang Y, Zhang S, Ahmad S, Luo Y. Synthesis and Photoactivated Toxicity of 2-Thiophenylfuranocoumarin Induce Midgut Damage and Apoptosis in *Aedes aegypti* Larvae. *J Agric Food Chem.* 2021 Jan 27;69(3):1091-1106. doi: 10.1021/acs.jafc.0c07237. Epub 2021 Jan 12. PMID: 33432806.
- [5] Zhou H, Zhang H, Ye R, Yan C, Lin J, Huang Y, Jiang X, Yuan S, Chen L, Jiang R, Zheng K, Cheng Z, Zhang Z, Dong M, Jin W. Pantothenate protects against obesity via brown adipose tissue activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2022 Jul 1;323(1): E69-E79. doi: 10.1152/ajpendo.00293.2021. Epub 2022 May 16. PMID: 35575231.

参考文献：

- [1] Agostinho F R, Réus G Z, Stringari R B, et al. Treatment with olanzapine, fluoxetine and olanzapine/fluoxetine alters citrate synthase activity in rat brain[J]. *Neuroscience letters*, 2011, 487(3): 278-281.

相关系列产品：

- BC0310/BC0315 辅酶I NAD (H) 含量检测试剂盒
- BC1030/BC1035 NAD 激酶 (NADK) 活性检测试剂盒
- BC0630/BC0635 NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒
- BC1130/BC1135 NAD-苹果酸酶 (NAD-ME) 活性检测试剂盒

