

柠檬酸合酶（CS）活性检测试剂盒说明书

可见分光光度法

货号：BC1060

规格：10T/5S、25T/12S、50T/24S

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

10T 溶液的配制：

- 1、试剂五：临用前加入 500 μL 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、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
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} : 样本的蛋白浓度, 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1 nmol TNB定义为一个酶活力单位。

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

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

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

$\Delta A_{\text{上清}}$: 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, 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：

- 1、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： $\Delta A1 = A2 - A1 = 1.213 - 0.7 = 0.513$, $\Delta A1' = A2' - A1' = 0$, $\Delta A_{\text{上清}} = \Delta A1 - \Delta A1' = 0.513$; 沉淀中： $\Delta A1 = A2 - A1 = 0.447 - 0.133 = 0.314$, $\Delta A1' = A2' - A1' = 0$, $\Delta A_{\text{沉淀}} = \Delta A1 - \Delta A1' = 0.314$ ，按样本质量计算酶活得：



$$\begin{aligned}\text{CS (U/g 质量)} &= \text{CS 上清} + \text{CS 沉淀} = 1061 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W + 212 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W \\ &= 1061 \times 0.513 \div 0.1 + 212 \times 0.314 \div 0.1 = 6108.7 \text{ U/g 质量}.\end{aligned}$$

相关发表文献:

- [1] Li J, Zhao C, Li C, Xue B, Wang S, Zhang X, Yang X, Shen Z, Bo L, He X, Qiu Z, Wang J. Multidrug-resistant plasmid RP4 increases NO and N₂O yields via the electron transport system in *Nitrosomonas europaea* ammonia oxidation. *Water Res.* 2023 Aug 15; 242:120266. doi: 10.1016/j.watres.2023.120266. Epub 2023 Jul 2. PMID: 37421866.
- [2] Xu Y, Chen B, Yi J, Tian F, Liu Y, Ouyang Y, Yuan C, Liu B. Buyang Huanwu Decoction alleviates cerebral ischemic injury through modulating caveolin-1-mediated mitochondrial quality control. *Front Pharmacol.* 2023 May 10;14:1137609. doi: 10.3389/fphar.2023.1137609. PMID: 37234709; PMCID: PMC10206009.
- [3] Pei Z, Zhou R, Yao W, Dong S, Liu Y, Gao Z. Different exercise training intensities prevent type 2 diabetes mellitus-induced myocardial injury in male mice. *iScience.* 2023 Jun 15;26(7):107080. doi: 10.1016/j.isci.2023.107080. PMID: 37416463; PMCID: PMC10320508.
- [4] Li F, Liu H, Wu X, Song Z, Tang H, Gong M, Liu L, Li F. Tetrathiomolybdate Decreases the Expression of Alkaline Phosphatase in Dermal Papilla Cells by Increasing Mitochondrial ROS Production. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 4;24(4):3123. doi: 10.3390/ijms24043123. PMID: 36834536; PMCID: PMC9960908.
- [5] Liang J, Zhang H, Zeng Z, Wu L, Zhang Y, Guo Y, Lv J, Wang C, Fan J, Chen N. Lifelong Aerobic Exercise Alleviates Sarcopenia by Activating Autophagy and Inhibiting Protein Degradation via the AMPK/PGC-1 α Signaling Pathway. *Metabolites.* 2021 May 18;11(5):323. doi: 10.3390/metabo11050323. PMID: 34069829; PMCID: PMC8157243.

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

