

柠檬酸合酶（CS）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1241

产品规格：100管/48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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体50mL×1瓶	-20℃
试剂一	液体10mL×1瓶	4℃
试剂二	液体0.6mL×1支	-20℃
试剂三	液体40mL×1瓶	4℃
试剂四	液体2mL×1瓶	4℃
试剂五	粉剂×2支	-20℃
试剂六	粉剂×1支	-20℃

溶液的配制：

1. 试剂五：临用前加入500 μ L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/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



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

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。

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

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, 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方为总酶活。
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。

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

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

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

$\Delta A_{\text{上清}}$: 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, 0.2mL; 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com