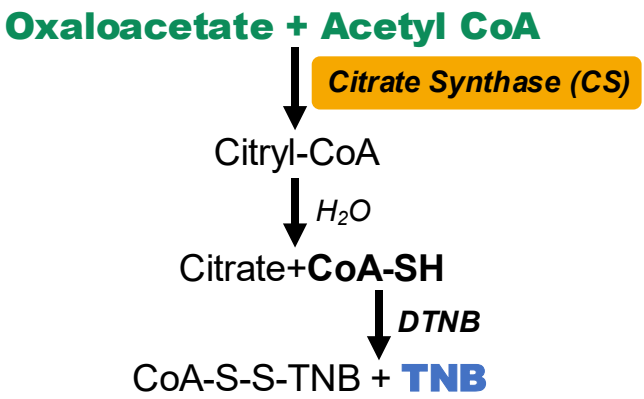
柠檬酸合酶（CS）活性检测试剂盒

Citrate Synthase (CS) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.

Catalog Number **AKAC007C-2**
Storage Temperature **-20°C**
Size **30T/15S**

Visible Spectrophotometry

柠檬酸合酶（CS）活性检测试剂盒

Citrate Synthase (CS) Activity Assay Kit

一、产品描述

柠檬酸合酶（CS）广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞的线粒体基质中，是细胞内多种代谢途径的关键限速酶及代谢变化的标志酶，具有高度底物特异性，仅催化乙酰 CoA 和草酰乙酸缩合生成柠檬酸和辅酶 A，作为三羧酸循环第一个限速酶，是该途径主要调控位点之一。

柠檬酸合酶催化乙酰 CoA 和草酰乙酸生成柠檬酰辅酶 A，进一步水解生成柠檬酸，DTNB 转变为黄色的 TNB，产物在 412 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征柠檬酸合酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 20 mL×1 瓶	-20℃保存	-
试剂一	液体 4 mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	液体 300 μL×1 支	-20℃避光保存	-
试剂三	液体 30 mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂四	液体 2 mL×1 瓶	4℃避光保存	-
试剂五	粉剂×2 支	-20℃避光保存	**使用前加入 500 μL 蒸馏水充分溶解** （分装后-20℃可保存 2 周，避免反复冻融）
试剂六	粉剂×1 支	-20℃避光保存	**使用前加入 1.5 mL 蒸馏水充分溶解** （分装后-20℃可保存 2 周，避免反复冻融）

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计、1 mL 玻璃比色皿（光径 10 mm、狭缝 3 mm、体积 1.05 mL）、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

①称取 100 mg 组织或收集 500 万细菌或细胞，加入 **1 mL 提取液**和 **10 μL 试剂二**，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，匀浆液 4℃ 600 g 离心 5 min，弃沉淀，**取上清液**；

②吸取步骤①离心后上清液转移至另一离心管中，4℃ 12000 g 离心 10 min；

③步骤②离心后上清液即**胞浆提取物**，可用于线粒体泄漏的 CS 活性测定（此步可选做）；

④步骤②离心后沉淀中加入 **200 μL 试剂一**和 **2 μL 试剂二**，反复吹打充分混匀即为**粗酶液**，用于线粒体 CS 的活性测定和蛋白含量的测定。

Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

2.测定步骤

①分光光度计预热 30 min 以上，调节波长至 412 nm，蒸馏水调零。

②使用前将**试剂三**置于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）预热 10 min（确保无沉淀）。

③**试剂六应用液的制备（现用现配）**：使用前根据使用量按试剂六：蒸馏水=1:4 的体积比配制。

④在 1 mL 玻璃比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组（μL）	对照组（μL）
试剂三	860	930
试剂四	35	35
试剂五	35	-
粗酶液	35	35
试剂六应用液	35	-

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s（总时间）时 412 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 对照；②37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）准确反应 120 s，测定 130 s（总时间）时 412 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 对照；③计算ΔA 测定=A2 测定-A1 测定，ΔA 对照=A2 对照-A1 对照，ΔA=ΔA 测定-ΔA 对照。注：每个样品均需设一个对照组。

3.柠檬酸合酶（CS）活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CS（U/mg prot）} = \frac{\Delta A \times V_{反总}}{\varepsilon \times d \times Cpr \times V_{样} \times T} = \frac{1050 \times \Delta A}{Cpr}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CS 上清液（U/g）} = \frac{\Delta A1 \times V_{反总} \times V_{提}}{\varepsilon \times d \times W \times V_{样} \times T} = \frac{1061 \times \Delta A1}{W}$$

$$\text{CS 沉淀（U/g）} = \frac{\Delta A2 \times V_{反总} \times V_{样总}}{\varepsilon \times d \times W \times V_{样} \times T} = \frac{212 \times \Delta A2}{W}$$

$$\text{CS（U/g）} = \text{CS 上清液} + \text{CS 沉淀} = \frac{1061 \times \Delta A1}{W} + \frac{212 \times \Delta A2}{W}$$

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Not for further distribution without written consent. Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{CS 上清液（U/10}^4\text{ cell）} = \frac{\Delta A1 \times V_{反总} \times V_{提}}{\varepsilon \times d \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{样} \times T} = \frac{1061 \times \Delta A1}{\text{细菌或细胞数量}}$$

$$\text{CS 沉淀（U/10}^4\text{ cell）} = \frac{\Delta A2 \times V_{反总} \times V_{样总}}{\varepsilon \times d \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{样} \times T} = \frac{212 \times \Delta A2}{\text{细菌或细胞数量}}$$

$$\text{CS（U/10}^4\text{ cell）} = \text{CS 上清液} + \text{CS 沉淀} = \frac{1061 \times \Delta A1}{\text{细菌或细胞数量}} + \frac{212 \times \Delta A2}{\text{细菌或细胞数量}}$$

注释：V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.035 mL；V 反总：反应体系总体积，1 mL；V 提：提取液体积，1.01 mL；V 样总：溶解沉淀的总体积，0.202 mL；ε：TNB 的摩尔消光系数，13.6×10^{-3} mL/nmol/cm；d：1 mL 玻璃比色皿光径，1 cm；T：酶促反应时间，2 min；Cpr：粗酶液蛋白浓度，mg/mL；细菌或细胞数量：以万计，若 500 万细菌或细胞则代入 500 即可；W：样本质量，g；ΔA1：上清液测定值（胞浆提取物）；ΔA2：沉淀测定值。

四、注意事项

①吸光值正常范围：A1 测定和 A2 测定在 0.02-1.5 之间，且 ΔA 在 0.02-1.0 之间；若吸光值未在正常范围内，可参照表格方案进行调整，计算时相应修改计算公式参数即可，建议做好预实验；

问题类型		调整粗酶液浓度				调整酶促反应时间	
A1 测定和 A2 测定（正常范围 0.02-1.5）	ΔA（正常范围 0.02-1.0）	稀释粗酶液	制备更高浓度	增加 V 样	减少 V 样	延长时间	缩短时间
高于 1.5	正常/高于 1.0	√	-	-	√	-	-
正常	低于 0.02	-	√	√	-	√	-
正常	高于 1.0	√	-	-	√	-	√

注：①粗酶液可使用**提取液**进行稀释，稀释倍数需进行预实验；②组织类样本粗酶液浓度可由 10%（w/v）最高提高至 20%（w/v），细胞类样本粗酶液浓度可由 500 万/mL 最高提高至 2000 万/mL；③酶促反应时间可延长至 10 min 以上；④若上述方法尝试仍无法达到吸光值要求，请及时与 Boxbio 技术支持联系：400-805-8228（7×24 h）。

②测定过程中粗酶液和所有试剂须冰上放置，以防止失活和变性；

③准确在规定时间点完成吸光值测定，以确保检测结果的准确性和重复性；

④推荐使用样本蛋白浓度计算酶活，若用样本质量、细菌和细胞数量计算，则需加测胞浆提取物 CS 活性，上清液（胞浆提取物）和沉淀（线粒体）酶活之和即为总酶活；

⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。