



柠檬酸合酶 (CS) 活性检测试剂盒

Citrate Synthase (CS) Activity Assay Kit

Oxaloacetate + Acetyl CoA



Citrate Synthase (CS)

Citryl-CoA



H_2O

Citrate+**CoA-SH**



DTNB

CoA-S-S-TNB + **TNB**

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



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 60 mL×1 瓶	-20°C 保存	-
试剂一	液体 12 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	液体 800 μ L×1 支	-20°C 避光保存	-
试剂三	液体 20 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂四	液体 2 mL×1 瓶	4°C 避光保存	-
试剂五	粉剂×1 支	-20°C 避光保存	使用前加入 500 μ L 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C 可保存 2 周，避免反复冻融)
试剂六	粉剂×1 支	-20°C 避光保存	使用前加入 1.5 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C 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：酶标仪、96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、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 μ L 试剂二，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，匀浆液 4°C 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°C 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 μ L 试剂一和 2 μ L 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。

2.测定步骤

- ①酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 412 nm。
- ②使用前将试剂三置于 37°C（哺乳动物）或 25°C（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 96 孔板中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	对照组 (μL)
试剂三	172	186
试剂四	7	7
试剂五	7	-
粗酶液	7	7
试剂六应用液	7	-

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°C（哺乳动物）或 25°C（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， $\Delta A = \Delta A$ 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。

$$CS \text{ (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}}}{\epsilon \times d \times C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{2101 \times \Delta A}{C_{\text{pr}}}$$

- 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。

$$CS \text{ 上清液 (U/g)} = \frac{\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}}}{\epsilon \times d \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{2122 \times \Delta A1}{W}$$

$$CS \text{ 沉淀 (U/g)} = \frac{\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}}}{\epsilon \times d \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{424 \times \Delta A2}{W}$$

$$CS \text{ (U/g)} = CS \text{ 上清液} + CS \text{ 沉淀} = \frac{2122 \times \Delta A1}{W} + \frac{424 \times \Delta A2}{W}$$

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。

$$\text{CS 上清液 (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A1 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{提}}}{\epsilon \times d \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{2122 \times \Delta A1}{\text{细菌或细胞数量}}$$

$$\text{CS 沉淀 (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A2 \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}}}{\epsilon \times d \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{424 \times \Delta A2}{\text{细菌或细胞数量}}$$

$$\text{CS (U/10}^4 \text{ cell)} = \text{CS 上清液} + \text{CS 沉淀} = \frac{2122 \times \Delta A1}{\text{细菌或细胞数量}} + \frac{424 \times \Delta A2}{\text{细菌或细胞数量}}$$

注释： V 样：反应体系中加入待测样本的体积，0.007 mL；V 反总：反应体系总体积，0.2 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：96 孔板光径，0.5 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； $\Delta A1$ ：上清测定值（胞浆提取物）； $\Delta A2$ ：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 0.02-0.9 之间，且 ΔA 在 0.02-0.6 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 0.02-0.9)	ΔA (正常范围 0.02-0.6)	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 0.9	正常/高于 0.6	√	-	-	√	-	-
正常	低于 0.02	-	√	√	-	√	-
正常	高于 0.6	√	-	-	√	-	√

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。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

