

柠檬酸合酶（CS）检测试剂盒（微量法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

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。

测定原理：

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；该反应促使无色的 DTNB 转变成黄色的 TNB，在 412nm 处有特征吸光值。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂二：液体 20mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂三：液体 1.5mL×1 支，-20℃ 保存；

试剂四：液体 28mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂五：粉剂×1 瓶，4℃ 保存；

试剂六：粉剂×1 支，-20℃ 保存，临用前加入 1.2mL 蒸馏水，用不完的试剂仍-20℃ 保存；

样本的前处理：

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 试剂一和 10uL 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- ② 将匀浆 600g，4℃ 离心 5min。
- ③ 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃ 离心 10min。
- ④ 上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的 CS（此步可选做）。
- ⑤ 在步骤④的沉淀中加入 200uL 试剂二和 2uL 试剂三，超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次），用于线粒体 CS 测定。

测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 412nm，蒸馏水调零。
2. 样本测定
 - （1）在试剂五中加入 0.6mL 无水乙醇和 13mL 试剂四，混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 5min；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融；
 - （2）**测定管**：在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10μL 样本、**220μL 试剂五**和 10μL 试剂六，混匀，37℃ 反应 15min 后立即测定吸光值 A1。
 - （3）**对照管**：在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10μL 样本、**220μL 试剂四**和 10μL 试剂六，混匀，37℃ 反应 15min 后立即测定吸光。值 A2。

(4) 计算 $\Delta A=A_1-A_2$ ，每个测定管设一个对照管。

CS 活性计算：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 117.6 \times \Delta A \div Cpr$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 23.8 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min /}10^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.0475 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 2.4×10^{-4} L； ϵ ：TNB 摩尔消光系数， 1.36×10^4 L / mol /cm；

d：比色皿光径，1cm； V 样：加入样本体积，0.01 mL； V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；

T：反应时间，15 min； Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL； W：样本质量，g；

500：细胞或细菌总数，500 万。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times Cpr) \div T = 235.3 \times \Delta A \div Cpr$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 47.5 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$CS \text{ (nmol/min /}10^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.095 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 2.4×10^{-4} L；

ϵ ：TNB 摩尔消光系数， 1.36×10^4 L / mol /cm；

d：96 孔板光径，0.5cm；

V 样：加入样本体积，0.01 mL；

V 样总：加入提取液体积，0.202 mL；

T：反应时间，15 min；

Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；

W：样本质量，g；

500：细胞或细菌总数，500 万。