

# 柠檬酸合酶 (CS) 检测试剂盒 (微量法)

货号: PMK1005

保存: -20°C 避光保存 6 个月

规格: 48T/96T

适用样本: 动物或植物组织、细胞

## 产品简介

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。本试剂盒提供了一种简单的检测方法检测生物样本中 CS 的活性, 其原理是 CS 可以催化乙酰 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, TNB 在 412nm 处有特征吸光值, 通过检测 412nm 处光吸收增加速率可以计算得到柠檬酸合酶的活性。

## 产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48 T	96 T	
试剂一	50mL	100mL	4°C 保存
试剂二	10mL	20mL	4°C 保存
试剂三	1mL	2mL	-20°C 避光保存
试剂四	15mL	30mL	4°C 保存
试剂五	1	1	4°C 避光保存
试剂六	1	1	-20°C 避光保存
试剂七	1	1	-20°C 避光保存

## 自备耗材

酶标仪或可见光分光光度计 (能测 412nm 处的吸光度)

96 孔板或微量玻璃比色皿、可调节式移液枪及枪头

低温离心机、水浴锅、制冰机

去离子水

匀浆器 (如果是组织样本)

## 试剂准备

试剂一: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

试剂二: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

试剂三: 即用型; 使用前, 平衡到室温; -20°C 避光保存。

试剂四: 即用型; 使用前, 平衡到室温; 4°C 保存。

工作液: 临用前配制, 48T 使用 11mL 试剂四溶解试剂五和试剂六; 96T 使用 22mL 试剂四溶解试剂五和试剂六; 未用完的工作液请分装 -20°C 避光保存, 避免反复冻融。

试剂七: 临用前配制, 48T 加入 0.5mL 去离子水, 充分溶解备用; 96T 加入 1mL 去离子水, 充分溶解备用; 未用完的试剂请 -20°C 避光保存, 避免反复冻融。

## 样本制备

## 产品说明书

组织、细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的提取：

1. 称取 0.1g 组织或收集 500 万个细胞，加入 1mL 试剂一和 10  $\mu$ L 试剂三，冰浴匀浆，600g，4 $^{\circ}$ C 离心 5min，收集上清至新的离心管中，舍弃沉淀。
2. 再次离心上清，11,000g，4 $^{\circ}$ C 离心 10min，分别得到上清和沉淀。
3. (选做)第 2 步的上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的 CS。
4. 在第 2 步的沉淀中，加入 200  $\mu$ L 试剂二和 2  $\mu$ L 试剂三混匀，用于线粒体 CS 测定。

**注意：样品处理等过程均需要在冰上进行，如果不立即进行实验，样本可在-80 $^{\circ}$ C 保存一个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。**

### 实验步骤

1. 酶标仪或可见光分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 412nm，可见光分光光度计去离子水调零。
2. 工作液 在 37 $^{\circ}$ C (哺乳动物) 或 25 $^{\circ}$ C (其它物种) 水浴提前预热 5min。
3. 在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入 10 $\mu$ L 样本、220 $\mu$ L 工作液和 10 $\mu$ L 试剂七，迅速混匀后于 412nm 检测，记录 20s 和 2min 20s 的吸光值，分别记为  $A_1$  和  $A_2$ ，计算  $\Delta A=A_2-A_1$ 。

**注意：1. 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  $\Delta A$  小于 0.001 可适当加大样本量，如果  $\Delta A$  大于 0.3，样本可用试剂二进一步稀释，计算结果乘以稀释倍数。**

**2. 因通过反应速率计算酶活，使用 96 孔板时请根据操作速度控制一次测定的样本数 (通常一次测定 4-8 个样本)。**

### 结果计算

A. 使用 96 孔板测定的计算公式

1. 按样本质量计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化 1nmol TNB 氧化定义为一个酶活力单位。

$$CS_{\text{上清}}(\text{U/g 质量}) = [\Delta A_{\text{上清}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1782.35 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W$$

$$CS_{\text{沉淀}}(\text{U/g 质量}) = [\Delta A_{\text{沉淀}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 356.47 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W$$

$$\text{总 CS}(\text{U/g 质量}) = CS_{\text{上清}} + CS_{\text{沉淀}} = 1782.35 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W + 356.47 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W$$

2. 按细胞数量计算：

单位的定义：每 1 万个细胞在反应体系中每分钟催化 1nmol TNB 氧化定义为一个酶活力单位。

$$CS_{\text{上清}}(\text{U}/10^4 \text{ Cell}) = [\Delta A_{\text{上清}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}} \times 500) \div T = 3.56 \times \Delta A_{\text{上清}}$$

$$CS_{\text{沉淀}}(\text{U}/10^4 \text{ Cell}) = [\Delta A_{\text{沉淀}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 0.713 \times \Delta A_{\text{沉淀}}$$

$$\text{总 CS}(\text{U}/10^4 \text{ Cell}) = CS_{\text{上清}} + CS_{\text{沉淀}} = 3.56 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W + 0.713 \times \Delta A_{\text{沉淀}}$$

3. 按蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化 1nmol DTNB 还原为 1 个酶活单位。

$$CS_{\text{上清}}(\text{U}/\text{mg prot}) = [\Delta A_{\text{上清}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1764.71 \times \Delta A_{\text{上清}} \div \text{Cpr}$$

$$CS_{\text{沉淀}}(\text{U}/\text{mg prot}) = [\Delta A_{\text{沉淀}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1764.71 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div \text{Cpr}$$

$$\text{总 CS}(\text{U}/\text{mg prot}) = CS_{\text{上清}} + CS_{\text{沉淀}} = 1764.71 \times (\Delta A_{\text{上清}} + \Delta A_{\text{沉淀}}) \div \text{Cpr}$$

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积， $2.4 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：TNB 摩尔消光系数， $1.36 \times 10^4$  L/mol /cm； $d$ ：0.5cm； $10^9$ ：1mol =  $1 \times 10^9$  nmol； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL； $V_{\text{提取}}$ ：加入试剂一和试剂三的总体积，1.01mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入试剂二和试剂三的总体积，0.202mL； $T$ ：反应时间，2min； $W$ ：样品质量，g； $\text{Cpr}$ ：上清液蛋白质浓度，mg/mL；500：细胞总数，500 万。

B. 使用微量玻璃比色皿测定公式

将上述计算公式中光径  $d$ ：0.5cm 调整为  $d$ ：1cm 进行计算即可。

### 注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

## 产品说明书

相关产品：

PMK0999 辅酶 I NAD(H) 检测试剂盒（微量法）

PMK1004 NADH 氧化酶（NOX）检测试剂盒（微量法）

PMK1000 NAD 激酶（NADK）检测试剂盒（微量法）

更多产品详情了解，请关注公众号：

