柠檬酸合酶（citrate synthase，CS）试剂盒说明书

（微板法 48 样）

一、产品简介：

柠檬酸合酶（CS，EC 2.3.3.1）几乎存在于所有的生物体中，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，是发生于线粒体中 TCA 循环入口的第一个限速酶，也与种子萌发和抗逆等有关，

柠檬酸合酶（CS）催化乙酰 CoA 和草酰乙酸产生柠檬酰辅酶 A，进一步水解成柠檬酸和辅酶 A；最后与显色剂作用生成黄色物质，该有色物质在 412nm 处有特征吸收峰，即可得出 CS 酶活性大小。

二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，再加入 0.6mL 蒸馏水溶解备用，
试剂二	粉剂 mg×1 支	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，再加入 1mL 蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体 16mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 2mL×1 瓶	4℃保存	若凝固，可在 25℃水浴温育片刻至全部融解后使用。
标准品	粉剂 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水

四、柠檬酸合酶（CS）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本制备：

① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃离心 15min，取上清，置冰上待测，

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1：5~10 的比例提取

② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃离心 15min，取上清，置冰上待测，

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10^4）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：澄清的液体直接检测；若浑浊则离心后取上清检测。

2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 412nm，

② 所有试剂解冻至室温（25℃）。试剂一和二和三和四也可按照 10:10:140:20 比例配成混合液（用多少配多少，现配现用），一枪加 180μL。

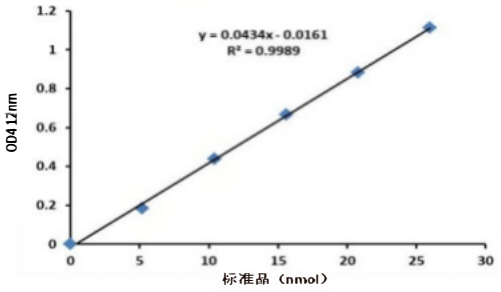
③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称（μL）	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	10	
试剂二	10	
试剂三	140	160
试剂四	20	20
混匀，30℃条件下反应 15min，立即于 412nm 处读取吸光值 A，ΔA=A 测定-A 对照（每个样本做一个自身对照），		

【注】：若ΔA 小于 0.01，可以延长反应时间 T（如：60min 或更长），或增加样本量 V1（如 30μL，则试剂一相应减少），或增加样本取样质量 W。则调整后的 T 和 V1 和 W 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程：y = 0.0434x - 0.0161，x 是标准品摩尔质量：nmol，y 是ΔA。



2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1 nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

CS(nmol/min/mg prot)=[(ΔA+0.0161)÷0.0434]÷(V1×Cpr) ÷T=76.8×(ΔA+0.0161)÷Cpr

3、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

CS(nmol/min/g 鲜重)=[(ΔA+0.0161)÷0.0434]÷(W×V1÷V)÷T=76.8×(ΔA+0.0161)÷W

4、按细菌或细胞密度计算：

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

CS(nmol/min/10^4 cell)=[(ΔA+0.0161)÷0.0434]÷(500×V1÷V)÷T=0.154×(ΔA+0.0161)

5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟催化产生 1 nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位，

CS(nmol/min/mL)=[(ΔA+0.0161)÷0.0434]÷V1÷T=76.8×(ΔA+0.0161)

V1---加入样本体积，0.02mL； V---加入提取液体积，1mL； T--反应时间，15 min；

W--样本质量，g； 500---细胞或细菌总数，万； CoA---分子量，767.5；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL；建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

1 制备标准品母液（2mg/mL）：用前甩几下使粉体落入底部，再加 0.5mL 蒸馏水溶解标准品（母液需在两天内用完且-20℃保存），

2 把母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。

3 依据测定管加样表操作，20μL 标准品+160μL 试剂三+20μL 试剂四，根据结果即可制作标准曲线。