柠檬酸合酶（citrate synthase，CS）试剂盒说明书

（货号：BP10389F 分光法 24 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 32mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 4mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂三	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4°C 离心 2mim 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 0.55mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	粉剂 1 支	-20℃避光保存	1. 临用前 8000g 4°C 离心 2mim 使试剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 加入 0.7mL 蒸馏水溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
标准品	粉剂 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

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。

③ 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。

2、检测步骤：

① 分光光度计预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 412nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温（25℃）

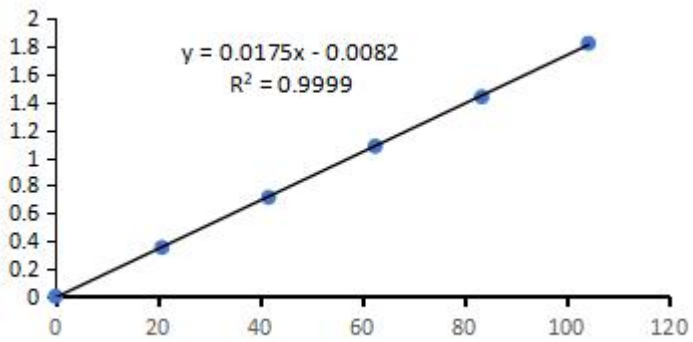
③ 在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	对照管
样本	80	80
试剂一	600	640
试剂二	80	80
试剂三	20	
试剂四	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 过小，可以延长反应时间 T（如：60min 或更长），或增加样本量 V1（如 120μL，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 = 0.0175x - 0.0082，x 是标准品摩尔质量：nmol，y 是ΔA。



2、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+0.0082)÷0.0175]÷(W×V1÷V)÷T=47.62(ΔA+0.0082)÷W

3、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+0.0082)÷0.0175]÷(V1×Cpr)÷T=47.62(ΔA+0.0082)÷Cpr

4、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+0.0082)÷0.0175]÷V1÷T=47.62(ΔA+0.0082)

5、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+0.0082)÷0.0175]÷(500×V1÷V)÷T=0.0952×(ΔA+0.0082)

V1---加入样本体积，0.08mL； 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的标准品：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。

3 依据测定管加样表操作，80μL 标准品+640μL 试剂一+80μL 试剂二，根据结果即可制作标准曲线。

附：标准曲线制作过程：

1 标曲为非必做实验，用户可根据实验需求制作标曲，亦可直接采用说明书计算公式进行结果计算。

2 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）

3 将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

4 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 500uL，加入 500uL 蒸馏水，混匀得到 1.mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
蒸馏水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

5 依据测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

在 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中依次加入：

试剂组分（μL）	标准管	0 浓度管（仅做一次）
标品	80	0
蒸馏水	0	80
试剂一	640	640
试剂二	80	80
混匀，30℃条件下反应 15min，立即于 412nm 处读取吸光值 A，△A=A 标准-A0 浓度。		