



## 柠檬酸合成酶（CS）测定试剂盒说明书(精简版)

(citroyl synthetase Kit 货号: A108-1)

## 一、技术背景:

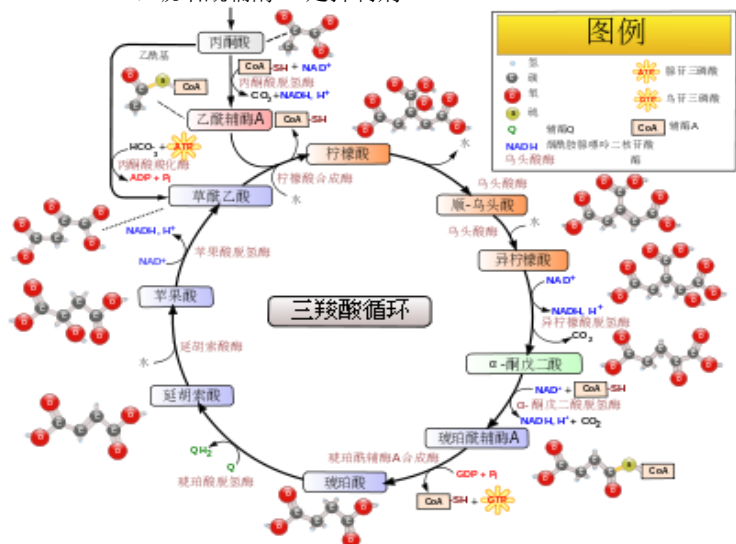
柠檬酸合成酶, 即 citroyl synthetase, 又称柠檬酸缩合酶, 在三羧酸循环 (又称柠檬酸循环) 中有非常重要的作用, 因为它催化的反应是关键步骤。而三羧酸循环是需氧生物体内普遍存在的代谢途径, 是三大营养素糖类、脂类、氨基酸代谢联系的枢纽和最终代谢通路。

三羧酸循环 (英语: Tricarboxylic acid cycle; TCA cycle), 或柠檬酸循环 (Citric acid cycle) 或克雷伯氏循环 (Krebs Cycle), 是需氧生物体内普遍存在的代谢途径, 因为在这个循环中几个主要的中间代谢物是含有三个羧基的柠檬酸, 因此得名; 或者以发现者汉斯 阿道夫 克雷伯命名为克雷伯氏循环, 简称克氏循环 (Krebs cycle)。三羧酸循环是三大营养素 (糖类、脂类、氨基酸) 的最终代谢通路, 又是糖类、脂类、氨基酸代谢联系的枢纽。

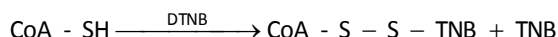
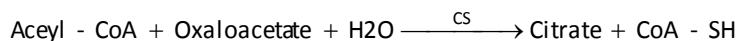
在三羧酸循环中, 反应物葡萄糖或者脂肪酸会变成乙酰辅酶 A。这种“活化醋酸” (一分子辅酶和一个乙酰基相连), 会在循环中分解生成最终产物二氧化碳并脱氢, 质子将传递给辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD<sup>+</sup>) 和黄素腺嘌呤 (FAD), 使之成为 NADH + H<sup>+</sup> 和 FADH<sub>2</sub>。NADH + H<sup>+</sup> 和 FADH<sub>2</sub> 会继续在呼吸链中被氧化成 NAD<sup>+</sup> 和 FAD, 并生成水。这种受调节的“燃烧”会生成 ATP, 提供能量。

真核生物的线粒体和原核生物的细胞质是三羧酸循环的场所。它是呼吸作用过程中的一步, 但在需氧型生物中, 它先于呼吸链发生。厌氧型生物则首先遵循同样的途径分解高能有机化合物, 例如糖酵解, 但之后并不进行三羧酸循环, 而是进行不需要氧气参与的发酵过程。

在三羧酸循环第一步反应中, 催化乙酰辅酶 A 的乙酰基与草酰乙酸的酮基结合生成柠檬酰辅酶 A, 以便后续高能硫酸键水解, 释放出辅酶 A, 得到柠檬酸。柠檬酸合成酶是一个调控酶, 此酶的底物乙酰辅酶 A 和草酰乙酸是它的激活剂, NADH、琥珀酰辅酶 A 是抑制剂。



## 二、测定原理:



## 三、所需仪器:

酶标仪 (412nm)、微量移液器、漩涡混匀器、高速离心机、37℃ 水浴/气浴箱、台式离心机、研钵或高速组织分散器 (匀浆机)、冰、双蒸水、离心管 (1.5mL 或 2mL)。

## 四、试剂组成及配制: (A108-1-1 20T)

## (一)、前处理试剂:

提取液 20mL ×1 瓶, 4℃ 保存。

冲洗液 50mL ×1 瓶, 4℃ 保存。

## (二)、反应试剂:

试剂一: 缓冲液 4mL ×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 底物液 0.6mL ×1 支, -20℃ 避光保存。

试剂三: 显色剂 0.6mL ×1 支, -20℃ 避光保存。

试剂四: 阴性对照液: 0.2mL ×1 支, 4℃ 避光保存。

## 五、试剂组成及配制: (A108-1-2 50T)

## (一)、前处理试剂:

提取液 50mL ×1 瓶, 4℃ 保存。

冲洗液 100mL ×1 瓶, 4℃ 保存。

## (二)、反应试剂:

试剂一: 缓冲液 10mL ×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂二: 底物液 1.4mL ×1 支, -20℃ 避光保存。

试剂三: 显色剂 1.4mL ×1 支, -20℃ 避光保存。

试剂四: 阴性对照液: 0.5mL ×1 支, 4℃ 避光保存。

## 六、试剂盒存放:

本试剂盒收到后按规定条件存放, 有效期 6 个月。

## 七、友情提醒:

本试剂盒内所有试剂仅限于科学研究使用, 不得用于临床诊断及药物治疗等。

## 八、操作步骤:

## 1、样本前处理:

## A) 方法一: 液氮研磨

①、**样本准备:** 取出新鲜组织或冷冻组织 (4℃ 解冻或室温解冻), 用冲洗液冲洗干净, 滤纸吸干, 准确称取组织重量 100~300mg, 加入液氮, 快速用研磨棒碾碎组织成粉末状, 备用。

②、**10% 待测悬液制备:** 取研磨后组织粉末称重置于离心 (1.5mL 或 2mL) 管中, 并按重量 (g): 体积 (mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积的提取液, 涡旋混匀器剧烈混匀 30 秒, 间隔 2 分钟, 重复操作 2~3 次, 制备 10% 待测悬液。放回冰槽环境回温。

③、**离心处理:** 将装有 10% 待测悬液的离心管置于 4℃ 台式离心机, 10000 转/分钟, 离心 10 分钟。

④、**10% 待测上清制备:** 取出离心管置于冰槽环境, 小心吸取 10% 待测上清液转移到新离心管 (1.5mL 或 2mL) 待测, 同时用考马斯亮蓝试剂 (或 BCA 试剂) 测定蛋白浓度 (本所有售)。

## B) 方法二: 机械匀浆 (如不具备液氮操作条件)

①、**10% 待测悬液制备:** 取出新鲜组织或冷冻组织 (4℃ 解冻或室温解冻), 用冲洗液冲洗干净, 滤纸吸干; 准确称取组织重量, 按重量 (g): 体积 (mL)=1:9 的比例, 加入 9 倍体积的提取液, 冰水浴条件下机械匀浆, 制备成 10% 待测悬液。

②、**离心制备 10% 待测上清:** 10000 转/分, 离心 10 分钟, 吸取上清即为 10% 的待测上清液。同时用考马斯亮蓝试剂 (或 BCA 试剂) 测定组织蛋白浓度 (本所有售)。

## 2、操作步骤:

## (1)、仪器准备:

将酶标仪设定到待测波长 (412nm), 预温 30min, 使之各项指标参数处于较稳定使用状态。

## (2)、试剂准备:

将冷冻试剂 (底物液、显色剂) 与冷藏试剂 (缓冲液、阴性对照液) 取出, 平衡至室温后使用。

## (3)、样本准备:

将待测样本置于冰槽回温平衡后待测。

**(4)、反应步骤（96 孔板操作）：**（附赠 96 孔板 1 块）

- a、取干净无菌 96 孔酶标板，置于试验台水平放置并标记待测样本编号，即 U 孔（或阴性对照孔，即 O 孔）；
- b、加入**试剂一（缓冲液）**190μL 于 96 孔酶标板 U 孔（或 O 孔）中；
- c、加入**试剂二（底物液）**25μL 于上述 U 孔（或 O 孔）中；
- d、加入**试剂三（显色剂）**25μL 于上述 U 孔（或 O 孔）中；
- e、将加入上述试剂 96 孔酶标板轻摇混匀并置于 37℃ 孵育箱 3~5min；
- f、取出装有预温试剂的 96 孔酶标板，水平置于试验台；
- g、加入**待测样本** 10μL 于上述 U 孔中（或阴性对照液 10μL 于 O 孔中）（**待测样本须澄清，冻存后复溶样本据情况需离心除去析出蛋白后再用**）；
- h、轻摇该酶标板，使**待测样本（或阴性对照液）**与预温试剂充分接触；并将该操作 96 孔酶标板转入酶标仪，波长 412nm，测定**待测样本**吸光度 OD 值，记为 AU<sub>0</sub>（阴性对照孔为 AO<sub>0</sub>）；
- i、将该 96 孔酶标板转入 37℃ 孵育箱（或者在 37℃ 恒温酶标仪）中温浴 15min；
- j、再将该操作 96 孔酶标板转入酶标仪，波长 412nm，测定**待测样本**吸光度 OD 值，记为 AU<sub>15</sub>（阴性对照孔为 AO<sub>15</sub>）；
- k、待测样本值（U 孔）：**待测样本**吸光度 AU<sub>15</sub>— **待测样本**吸光度 AU<sub>0</sub>。

【阴性对照值（O 孔）：AO<sub>15</sub>-AO<sub>0</sub>】**九、简易操作表：**

|                                                                                                                                                                     | 阴性对照孔 | 待测样本孔 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|
| 试剂一（μL）                                                                                                                                                             | 190   | 190   |
| 试剂二（μL）                                                                                                                                                             | 25    | 25    |
| 试剂三（μL）                                                                                                                                                             | 25    | 25    |
| 轻摇混匀，37℃ 孵育箱温浴 3~5min                                                                                                                                               |       |       |
| 阴性对照液(μL)                                                                                                                                                           | 10    |       |
| 待测样本(μL)                                                                                                                                                            |       | 10    |
| 充分混匀（或 96 孔板以震荡混匀），并置于酶标仪中，波长 412nm，测定初始吸光度 A <sub>0</sub> 值；转入 37℃ 孵育箱（或者在 37℃ 水浴箱）中温浴 15min，即刻放入酶标仪，测定吸光度 A <sub>15</sub> 。计算 ΔA= A <sub>15</sub> -A <sub>0</sub> |       |       |

**十、计算公式：**

$$\text{CS 活力 (U/mgprot)} = \frac{\Delta \text{AU} - \Delta \text{AO}}{13.6 \times 10^{-3} \times d \times T} \times N_1 \div \text{Cpr} \times N$$

注：AU 代表测定孔吸光度值，AO 代表空白孔吸光度值；

13.6×10<sup>-3</sup> 为微摩尔消光系数；

T：反应时间，15 分钟；

d：比色光径，cm；

N1：体系稀释倍数，25；

N：样本测试前稀释倍数。

Cpr：样本蛋白浓度，mgprot/mL（prot 指蛋白）。

**十一、本法优点：**

- 1、此方法灵敏度高，仅需微量样品即可测定。
- 2、操作方法简便、快速，测定结果准确稳定。

**附录 I： CS 标准曲线绘制**

- 1、**试剂及配制：**由南京建成生物工程研究所提供并按说明书配制。另取柠檬酸合成酶（CS）标准品，用双蒸水稀释成不同浓度，待测。
- 2、按说明书操作表进行测定。
- 3、按照标准品活力值为横坐标，绝对 OD 值为纵坐标绘制标准曲线：

