

CheKine™ 柠檬酸合酶 (CS) 活性检测试剂盒 (微量法)

货号: KTB1023

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

	适用样本: 动植物组织、细胞
	保质期: -20℃, 避光保存 6 个月

01 背景与原理

柠檬酸合酶 (Citrate Synthase, 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。

本试剂盒检测原理是 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 412 nm 处有特征吸光值, 通过检测 412 nm 处光吸收增加速率可以计算得到柠檬酸合酶的活性。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Extraction Buffer	60 mL	60 mL×2	4℃
Reagent I	12 mL	24 mL	4℃
Reagent II	0.75 mL	1.5 mL	-20℃, 避光保存
Reagent III	15 mL	30 mL	4℃
Reagent IV	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃, 避光保存
Reagent V	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃, 避光保存
Reagent VI	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃, 避光保存

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 412 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水	检测体系配置用
其他	匀浆器（组织样本）、水浴锅、制冰机、恒温箱、低温离心机、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本公司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Extraction Buffer	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent I	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent II	即用型	-20℃避光保存； Reagent II 有毒，建议在通风橱进行实验
Reagent III	即用型；使用前，平衡到室温	4℃保存
Working Reagent	临用前配制，48 T 使用 13.2 mL Reagent III 溶解 Reagent IV 和 Reagent V；96 T 使用 26.4 mL Reagent III 溶解 Reagent IV 和 Reagent V	未用完的试剂请分装-20℃避光保存 1 个月，避免反复冻融
Working Reagent VI	临用前配制，48 T 加入 0.6 mL 去离子水，充分溶解备用；96 T 加入 1.2 mL 去离子水，充分溶解备用	未用完的试剂请-20℃避光保存 1 个月，避免反复冻融

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月，处理好的样本须当天检测。上清和沉淀中可能都存在酶活，建议两部分都检测，加和结果更准确。该试剂盒提取的样本也可以适用于 KTB1270、KTB1290、KTB1280、KTB1240、KTB1230、KTB1250 的测定。

● 组织、细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的提取：

1. 称取约 0.1 g 组织或收集 5×10^6 个细胞，加入 1 mL Extraction Buffer 和 10 μ L Reagent II，冰浴匀浆，600 g，4℃离心 5 min，收集上清至新的离心管中，舍弃沉淀。
2. 再次离心上清，11000 g，4℃离心 10 min，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 μ L Reagent I 和 2 μ L Reagent II 混匀，用于线粒体 CS 测定。

05-3 实验步骤

1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 412 nm。
2. Working Reagent 在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴提前预热 5 min。
3. 检测体系配制：在 96 孔板中依次加入 10 μ L 样本、220 μ L Working Reagent 和 10 μ L Working Reagent VI。
4. 吸光度检测：迅速混匀后于 412 nm 检测，记录 20 s 和 2 min 20 s 的吸光值，分别记为 A_1 和 A_2 。上清孔的记为 $A_{\text{上清}}$ ，沉淀孔的记为 $A_{\text{沉淀}}$ 。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn) > 进入“技术中心”> 查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ ， $\Delta A_{\text{上清}} = A_{2\text{上清}} - A_{1\text{上清}}$ ， $\Delta A_{\text{沉淀}} = A_{2\text{沉淀}} - A_{1\text{沉淀}}$

2. 样本 CS 活性计算

● 按样本质量计算

单位的定义：在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）中，每 g 组织在反应体系中每分钟催化 1 nmol TNB 氧化定义为一个酶活力单位。

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

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

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

● 按细胞数量计算

单位的定义：在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）中，每 1 万个细胞在反应体系中每分钟催化 1 nmol TNB 氧化定义为一个酶活力单位。

$$CS_{\text{上清}} (U/10^4) = [\Delta A_{\text{上清}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 1782.35 \times \Delta A_{\text{上清}} \div N$$

$$CS_{\text{沉淀}} (U/10^4) = [\Delta A_{\text{沉淀}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \div V_{\text{样总}} \times V_{\text{样}}) \div T = 356.47 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div N$$

$$\text{总 CS (U/10^4)} = CS_{\text{上清}} + CS_{\text{沉淀}} = 1782.35 \times \Delta A_{\text{上清}} \div N + 356.47 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div N$$

$\Delta A_{\text{上清}}$ ：上清测定值； $\Delta A_{\text{沉淀}}$ ：沉淀测定值； $V_{\text{反应}}$ ：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 ：0.5 cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01 mL； $V_{\text{提取}}$ ：加入提取液体积，1.01 mL； 10^9 ：单位换算系数，1 mol = 10^9 nmol； $V_{\text{样总}}$ ：加入 Reagent I 和 II 的体积，0.202 mL； T ：反应时间，2 min； W ：样品质量，g； N ：细胞数量，以 10^4 为单位（例如细胞数量为 5×10^6 ， $N=500$ ）。

07 结果展示

示例-1: 称取 0.1 g 澳洲柑果肉, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板进行检测。测得: $\Delta A_{\text{上清}} = A_{2\text{上清}} - A_{1\text{上清}} = 0.123 - 0.120 = 0.003$, $\Delta A_{\text{沉淀}} = A_{2\text{沉淀}} - A_{1\text{沉淀}} = 0.145 - 0.132 = 0.013$, 按样本质量计算得: 总 CS (U/g) = $1782.35 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W + 356.47 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W = 99.812$ U/g。

示例-2: 称取 0.1 g 黄豆种子, 按照测定步骤操作, 用 96 孔板进行检测。测得: $\Delta A_{\text{上清}} = A_{2\text{上清}} - A_{1\text{上清}} = 0.676 - 0.565 = 0.112$, $\Delta A_{\text{沉淀}} = A_{2\text{沉淀}} - A_{1\text{沉淀}} = 1.005 - 0.983 = 0.022$, 按样本质量计算得: 总 CS (U/g) = $1782.35 \times \Delta A_{\text{上清}} \div W + 356.47 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div W = 2074.65$ U/g。

08 FAQ

● 检测得到的样本 ΔA 高或者过低怎么办?

如果 ΔA 小于 0.01 可适当加大样本量。如果 ΔA 大于 0.3, 样本可用对应的 Extraction Buffer 进一步稀释, 或减少提取用样本量, 再重新进行测定。

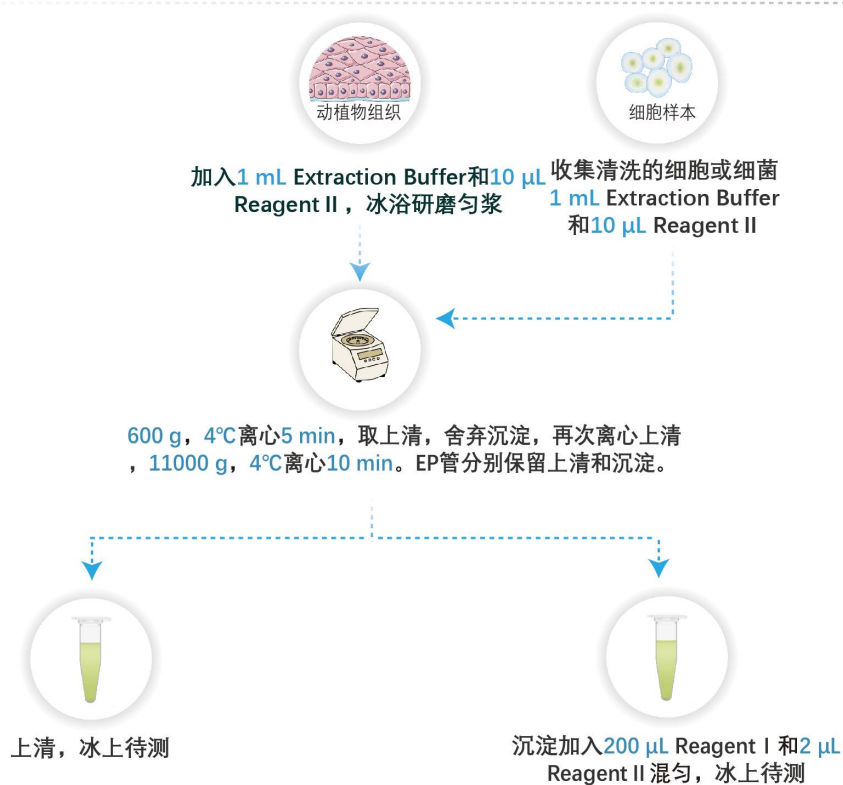
09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1270	CheKine™ 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒 (微量法)
KTB1250	CheKine™ 线粒体异柠檬酸脱氢酶 (ICDHm) 活性检测试剂盒 (微量法)
KTB1230	CheKine™ 琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性检测试剂盒 (微量法)
KTB1240	CheKine™ α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDH) 活性检测试剂盒 (微量法)

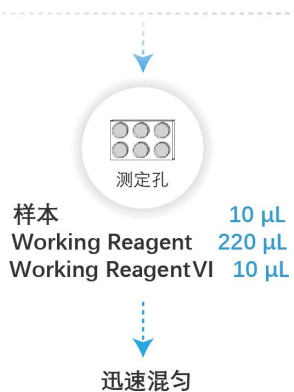
CheKine™ 柠檬酸合酶（CS）活性检测流程示意图

(Abbkin 货号：KTB1023)

样本处理



体系配置



数据检测

