

檸檬酸合酶 (citrate synthase , CS) 試劑盒說明書

分光光度法 50 管/24 樣

注 意：正式測定前務必取 2-3 個預期差異較大的樣本做預測定

測定意義：

CS (EC 2.3.3.1) 廣泛存在於動物、植物、微生物和培養細胞的線粒體基質中，是三羧酸迴圈第一個限速酶，是三羧酸迴圈主要調控位點之一。

測定原理：

CS 催化乙醯 CoA 和草醯乙酸產生檸檬醯輔酶 A，進一步水解產生檸檬酸；該反應促使無色的 DTNB 轉變成黃色的 TNB，在 412nm 處有特徵吸光值。

自備儀器和用品：

可見分光光度計、臺式離心機、水浴鍋、可調式移液器、1mL 玻璃比色皿、研鉢、冰、無水乙醇和蒸餾水

試劑組成和配制：

試劑一：液體 50mL×1 瓶，-20°C 保存；

試劑二：液體 10mL×1 瓶，-20°C 保存；

試劑三：液體 1mL×1 支，-20°C 保存；

試劑四：液體 55mL×1 瓶，4°C 保存；

試劑五：粉劑×1 瓶，4°C 保存；

試劑六：粉劑×1 支，-20°C 保存，臨用前加入 2.4mL 蒸餾水，用不完的試劑仍-20°C 保存；

樣本的前處理：

組織、細菌或細胞中胞漿蛋白與線粒體蛋白的分離：

- ① 稱取約 0.1g 組織或收集 500 萬細胞，加入 1mL 試劑一和 10uL 試劑三，用冰浴勻漿器或研鉢勻漿。
- ② 將勻漿 600g，4°C 離心 5min。
- ③ 棄沉澱，將上清液移至另一離心管中，11000g，4°C 離心 10min。
- ④ 上清液即胞漿提取物，可用於測定從線粒體洩漏的 CS (此步可選做)。
- ⑤ 在步驟④的沉澱中加入 200uL 試劑二和 2uL 試劑三，超聲波破碎 (冰浴，功率 20% 或 200W，超聲 3 秒，間隔 10 秒，重複 30 次)，用於線粒體 CS 測定。

測定步驟：

1、分光光度計或酶標儀預熱 30min 以上，調節波長至 412nm，蒸餾水調零。

2、樣本測定

(1) 在試劑五中加入 1.2mL 無水乙醇和 26mL 試劑四，混勻，37°C (哺乳動物) 或 25°C (其他物種) 孵育 5min；用不完的試劑分裝後-20°C 保存，禁止反復凍融；

(2) 測定管：在 EP 管中加入 40μL 樣本、880μL 試劑五和 40μL 試劑六，混勻，37°C 反應 15min 後立即測定吸光值 A1。

(3) 對照管：在 EP 管中加入 40 μ L 樣本、880 μ L 試劑四和 40 μ L 試劑六，混勻，37 $^{\circ}$ C 反應 15min 後立即測定吸光值 A2。

(4) 計算 $\Delta A = A1 - A2$ ，每個測定管設一個對照管。

CS 活性計算：

(1) 按樣本蛋白濃度計算：

單位的定義：每 mg 組織蛋白每分鐘催化產生 1 nmol TNB 定義為一個酶活力單位。

$$CS (\text{nmol/min /mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反總}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{樣}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 117.6 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要自行測定樣本蛋白質濃度。

(2) 按樣本鮮重計算：

單位的定義：每 g 組織每分鐘催化產生 1 nmol TNB 定義為一個酶活力單位。

$$CS (\text{nmol/min /g 鮮重}) = [\Delta A \times V_{\text{反總}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{樣}} \div V_{\text{樣總}}) \div T = 23.8 \times \Delta A \div W$$

(3) 按細菌或細胞密度計算：

單位的定義：每 1 萬個細菌或細胞每分鐘催化產生 1 nmol TNB 定義為一個酶活力單位。

$$CS (\text{nmol/min /}10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反總}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{樣}} \div V_{\text{樣總}}) \div T = 0.0475 \times \Delta A$$

$V_{\text{反總}}$ ：反應體系總體積，9.6 $\times 10^{-4}$ L； ϵ ：TNB 摩爾消光係數，1.36 $\times 10^4$ L / mol / cm； d ：比色皿光徑，1cm； $V_{\text{樣}}$ ：加入樣本體積，0.04 mL； $V_{\text{樣總}}$ ：加入提取液體積，0.202 mL； T ：反應時間，15 min； C_{pr} ：樣本蛋白質濃度，mg/mL； W ：樣本品質，g；500：細胞或細菌總數，500 萬。