（本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断！）

**产品货号：E-BC-K178-M**

**产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)**

**检测仪器：酶标仪(402-422 nm)**

# Elabscience®柠檬酸合酶(CS)比色法测试盒

# Citrate Synthase(CS) Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

## 用途

本试剂盒适用于检测动、植物组织和细胞样本中柠檬酸合酶(CS)的活力。

## 检测原理

柠檬酸合成酶(CS)催化乙酰辅酶 A 和草酰乙酸产生柠檬酰辅酶 A，进一步产生辅酶 A，该反应能生成黄色物质，在 412 nm 处有特征吸光值，通过吸光值的增加来检测 CS 酶活。

本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

## 提供试剂和物品

| 编号 | 名称 | 规格 1 (Size 1)(48 T) | 规格 2 (Size 2)(96 T) | 保存方式 (Storage) |
|---|---|---|---|---|
| 试剂一 (Reagent 1) | 提取液 (Extraction Solution) | 50 mL×1 瓶 | 50 mL×2 瓶 | -20ºC 保存 3 个月 |
| 试剂二 (Reagent 2) | 缓冲液 (Buffer Solution) | 9 mL×1 瓶 | 18 mL×1 瓶 | -20ºC 保存 3 个月 |
| 试剂三 (Reagent 3) | 底物 (Substrate) | 1.8 mL×1 支 | 1.8 mL×2 支 | -20ºC 避光 保存 3 个月 |
| 试剂四 (Reagent 4) | 显色剂 (Chromogenic Agent) | 1.6 mL×1 支 | 1.6 mL×2 支 | -20ºC 避光 保存 3 个月 |
| 试剂五 (Reagent 5) | 标准品 (Standard) | 粉剂×1 支 | 粉剂×2 支 | -20ºC 避光 保存 3 个月 |
| | 96 孔酶标板 | 1 板 | | |
| | 96 孔覆膜 | 2 张 | | |
| | 样本位置标记表 | 1 张 | | |

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

## 所需自备物品

**仪器：**酶标仪(402-422 nm，最佳检测波长 412 nm)，恒温箱(37$^{o}$C)

## 试剂准备

① 检测前，除试剂四外，其它试剂平衡至室温。

② 试剂四室温融化后立即置于冰盒待用，放置时间不超过 2 h，使用完立即放回-20$^{o}$C 保存。

③ 10 mmol/L标准品溶液的配制：

取一支试剂五加入1 mL双蒸水充分溶解，得到10 mmol/L的标准品溶液。未用完部分分装，-20$^{o}$C避光可保存3天，禁止反复冻融。

④ 1 mmol/L标准品溶液的配制：

按照10 mmol/L标准品溶液：双蒸水=1：9的体积比混匀得到1 mmol/L标准品溶液，现配现用，按需配制，配好的1 mmol/L标准品溶液在2 h内使用。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

| 编号 | ① | ② | ③ | ④ | ⑤ | ⑥ | ⑦ | ⑧ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **标准品浓度(mmol/L)** | **0** | **0.2** | **0.3** | **0.4** | **0.6** | **0.8** | **0.9** | **1** |
| **1 mmol/L 标准品(μL)** | 0 | 40 | 60 | 80 | 120 | 160 | 180 | 200 |
| **双蒸水(μL)** | 200 | 160 | 140 | 120 | 80 | 40 | 20 | 0 |

## 样本准备

### ① 样本处理

组织样本：匀浆液为试剂一，匀浆离心后取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

细胞样本：取$1\times10^6$细胞加入200 μL试剂一匀浆，离心后取上清待测，留取部分上清进行蛋白浓度测定。

### ② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的检测范围：2.09–110 U/L，可参考下表进行稀释(仅供参考)：

| 样本 | 稀释倍数 | 样本 | 稀释倍数 |
|---|---|---|---|
| 10%大鼠肾组织 | 不稀释 | 10%大鼠脾组织 | 不稀释 |
| 10%大鼠肝组织 | 不稀释 | 10%大鼠心组织 | 不稀释 |
| 10%小鼠肝组织 | 不稀释 | 10%大鼠肺组织 | 不稀释 |

注：稀释液为试剂一。

## 实验关键点

① 试剂加入体系时应注意避免气泡产生，以免影响测定结果。

② 试剂四需-20°C 保存，融化后立即置于冰盒待用，放置时间不超过 2 h，使用完立即放回-20°C 保存。

## 操作步骤

① 取 125 μL 试剂二加入相应的各标准孔和测定孔中。

② 向步骤①中各孔依次加入 30 μL 试剂三。

③ 向步骤②中各孔依次加入 20 μL 试剂四。

④ 振板 3 s，37ºC 孵育 3 min。

⑤ 标准孔：向步骤④各标准孔加入 10 μL 不同浓度的标准品；
测定孔：向步骤④各测定孔加入 10 μL 待测样本。

⑥ 振板 3 s，酶标仪于 412 nm 波长检测各孔 OD 值 $A_1$。

⑦ 37ºC 孵育 8 min。

⑧ 振板 3 s，酶标仪于 412 nm 波长检测各孔 OD 值 $A_2$，计算样本变化 OD 值$\triangle A_{412}$，$\triangle A_{412} = A_2 - A_1$，标准孔按照 $A_2$ 值绘制标准曲线。

## 操作表

| | 标准孔 | 测定孔 |
|---|---|---|
| 试剂二(μL) | 125 | 125 |
| 试剂三(μL) | 30 | 30 |
| 试剂四(μL) | 20 | 20 |
| 振板 3 s，37ºC 孵育 3 min。 | | |
| 不同浓度标准品(μL) | 10 | -- |
| 待测样本(μL) | -- | 10 |
| 振板 3 s，酶标仪于 412 nm 波长检测各孔 OD 值 $A_1$。 | | |
| 37ºC 孵育 8 min，振板 3 s，酶标仪于 412 nm 波长检测各孔 OD 值 $A_2$，计算样本变化 OD 值$\triangle A_{412}$，$\triangle A_{412} = A_2 - A_1$，标准孔按照 $A_2$ 值绘制标准曲线。 | | |

**本试剂盒检测组织和细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用 BCA 法。(货号：E-BC-K318-M)。**

## 结果计算

**标准曲线：y = ax + b**

**组织和细胞样本中 CS 活力计算公式：**

**定义：**37℃ 条件下，每克组织或细胞蛋白每分钟生成 1 μmol 辅酶 A 所需要的 CS 酶量为一个活力单位。

$$\text{CS 活性 (U/gprot)} = (\Delta A_{412} - b) \div a \div T \times 1000 \div C_{pr} \times f$$

**注解**:

y：标准孔 OD 值-空白孔 OD 值(标准品浓度为 0 时 OD 值；标准曲线计算时只需要使用 $A_2$ 值)

x：标准品的浓度

a：标曲的斜率

b：标曲的截距

$\Delta A_{412}$：测定孔变化 OD 值

T：孵育反应时间，8 min

1000：1 mmol/L = 1000 μmol/L

$C_{pr}$：组织或细胞的蛋白浓度，gprot/L

f：样本加入检测体系前的稀释倍数

# 附录1 关键数据

## 1. 技术参数

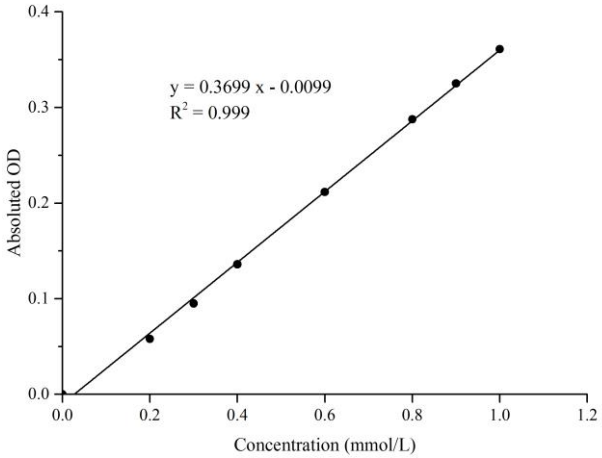
| | | | |
|---|---|---|---|
| **检测范围** | 2.09–110 U/L | **平均批间差** | 7.9 % |
| **灵敏度** | 2.09 U/L | **平均批内差** | 5 % |
| **平均回收率** | 104 % | | |

## 2. 标准曲线(数据仅供参考)

① 不同浓度标准品加样量10 μL，按照操作步骤进行实验，各点OD值如下表所示：

| **标准品浓度 (mmol/L)** | **0** | **0.2** | **0.3** | **0.4** | **0.6** | **0.8** | **0.9** | **1** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **测定 OD 值** | 0.145 | 0.212 | 0.239 | 0.288 | 0.369 | 0.441 | 0.478 | 0.510 |
| | 0.157 | 0.206 | 0.253 | 0.286 | 0.356 | 0.436 | 0.474 | 0.514 |
| **平均 OD 值** | 0.151 | 0.209 | 0.246 | 0.287 | 0.363 | 0.439 | 0.476 | 0.512 |
| **绝对 OD 值** | 0.000 | 0.058 | 0.095 | 0.136 | 0.212 | 0.288 | 0.325 | 0.361 |

② 绘制标曲(如下图)：



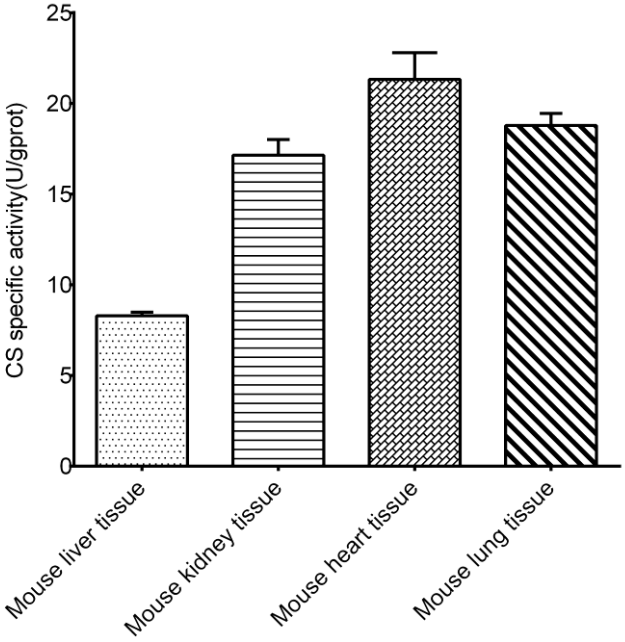
# 附录2 实例分析

**例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考):**

取10%小鼠肝组织匀浆上清液10 μL，按操作表操作，结果如下：标准曲线：y = 0.3699 x - 0.0099，测定初始OD值$A_1$为0.695，反应8 min后测定OD值$A_2$为0.871，$\Delta A_{412} = A_2 - A_1 = 0.871 - 0.695 = 0.176$，10%小鼠肝组织匀浆蛋白浓度为7.40 gprot/L，计算结果为：

$$\text{CS 活力 (U/gprot)} = (0.871 - 0.695 + 0.0099) \div 0.3699 \div 8 \times 1000 \div 7.40 = 8.49 \text{ U/gprot}$$

按照说明书操作，测定小鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度7.40 gprot/L，加样量10 μL)、小鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白浓度5.36 gprot/L, 加样量10 μL)、小鼠心组织(10%组织匀浆蛋白浓度3.73 gprot/L，加样量10 μL)和小鼠肺组织(10%组织匀浆蛋白浓度2.57 g/prot，加样量10 μL)中CS活力(如下图)：



## 附录3 问题答疑

| 问题 | 可能原因 | 建议解决方案 |
| --- | --- | --- |
| 标准品测定值复孔差较大 | 反应体系有气泡 | 消除气泡或重新检测 |

**声明**

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。