

甲基柠檬酸合酶 (MCS) 活性检测试剂盒 (微量法)

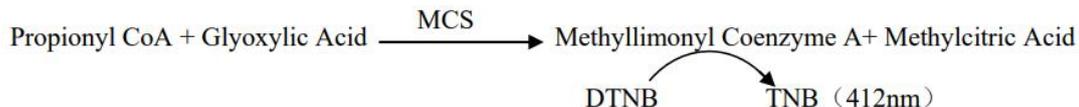
产品货号: BA2149

产品规格: 100T/48S

产品简介:

甲基柠檬酸合酶 (methyl-citrate synthase, MCS) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞的线粒体基质中, 与柠檬酸合酶 (CS) 共同参与三羧酸循环的调节。

MCS催化丙酰CoA和草酰乙酸产生甲基柠檬酰辅酶A, 进一步水解产生甲基柠檬酸; 该反应促使DTNB转变成黄色的TNB, 在412nm处有特征吸收峰, 据此可以计算MCS活性。



产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体60mL×1瓶	-20℃
试剂一	液体0.6mL×1支	-20℃
试剂二	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂三	液体1mL×1支	2-8℃
试剂四	粉剂×1支	-20℃
试剂五	粉剂×1支	-20℃

溶液的配制:

1. 试剂四: 临用前加入0.5mL蒸馏水充分溶解, 未用完的试剂-20℃分装保存4周, 避免反复冻融。
2. 试剂五: 临用前加入1.5mL蒸馏水充分溶解, 未用完的试剂-20℃分装保存4周, 避免反复冻融。

需自备的仪器和用品:

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、天平、低温离心机、水浴锅、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1. 组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液) 和 10μL 试剂一, 进行冰浴匀浆。12000g, 4℃离心 10min, 取上清置于冰上待测。
2. 细菌/细胞: 按照细菌/细胞数量 (10⁶ 个): 提取液体积 (mL) 为 5~10: 1 的比例 (建议 5 百万细菌/细胞加入 1mL 提取液和 10μL 试剂一), 冰浴超声波破碎 (功率 200W, 超声 3 秒, 间隔 7 秒, 总时间 5min); 然后 12000 g, 4℃离心 10min, 取上清置于冰上待测。

二、测定步骤

1. 可见分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 412nm, 分光光度计用蒸馏水调零。
2. 试剂二置于 37℃水浴中预热 15min。
3. 操作表: 在微量比色皿/96孔板中依次加入 (适用于测定动物组织样本):



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

试剂名称 (μL)	测定管	测定管
试剂二	50	-
试剂三	-	50
试剂四	-	-
样本	50	50
试剂五	50	50

在微量比色皿/96孔板中分别加入上述试剂，充分混匀后记录 412nm 下 10s 时的初始吸光度 A1 对照、A1 测定，之后迅速将比色皿连同反应液一起置于 37°C 水浴中准确反应 5min，迅速取出比色皿并擦干，412nm 下记录 5min10s 时的吸光度 A2 对照、A2 测定，计算 $\Delta A = (A2 \text{ 测定} - A1 \text{ 测定}) - (A2 \text{ 对照} - A1 \text{ 对照})$ 。

4. 操作表：在微量比色皿/96孔板中分别加入（适用于测定微生物及植物组织样本）

试剂名称 (μL)	测定管	测定管
试剂二	153	127
试剂三	7	7
试剂四	-	8
样本	40	40
试剂五	-	18

在微量比色皿/96孔板中分别加入上述试剂，充分混匀后记录 412nm 下 10s 时的初始吸光度 A1 对照、A1 测定，之后迅速将比色皿连同反应液一起置于 37°C 水浴中准确反应 30min，迅速取出比色皿并擦干，412nm 下记录 30min10s 时的吸光度 A2 对照、A2 测定，计算 $\Delta A = (A2 \text{ 测定} - A1 \text{ 测定}) - (A2 \text{ 对照} - A1 \text{ 对照})$ 。

三、甲基柠檬酸合酶 (MCS) 计算公式

1. 使用 96 孔板测定 (动物组织样本)：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 700.28 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算：

酶活定义：每 g 组织在反应体系中每分钟产生 1nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS 活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反} \div (W \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样}) \div T = 707.28 \times \Delta A \div W$$

ϵ ：TNB 摩尔消光系数， $13.6 \times 10^{-3} \text{ mL}/(\text{nmol} \cdot \text{cm})$ ； d ：比色皿光径，0.6cm； $V \text{ 反}$ ：反应体系体积，0.2mL； $V \text{ 样}$ ：反应体系中加入的样本体积，0.007mL； $V \text{ 提取}$ ：加入提取液及试剂一的体积，1.01mL； T ：反应时间，5min； Cpr ：样本蛋白浓度，mg/mL； W ：样本质量，g。

2. 使用 96 孔板测定 (微生物及植物组织样本)：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化产生 1nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 20.42 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算：

酶活定义：每 g 组织在反应体系中每分钟产生 1nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS 活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反} \div (W \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样}) \div T = 20.63 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌/细胞计算：



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com

酶活定义：每 10^6 个细菌/细胞在反应体系中每分钟催化产生 1nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS 活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反}} \div (N \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 20.63 \times \Delta A \div N$$

ϵ : TNB 摩尔消光系数, $13.6 \times 10^3 \text{ mL}/(\text{nmol} \cdot \text{cm})$; d : 比色皿光径, 0.6cm; $V_{\text{反}}$: 反应体系体积, 0.2mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入的样本体积, 0.040mL; $V_{\text{提取}}$: 加入提取液及试剂一的体积, 1.01mL; T : 反应时间, 30min; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; N : 细菌或细胞总数, 以 10^6 计。

3. 使用微量比色皿测定:

将上述公式中的 $d=0.6\text{cm}$ 改为 $d=1\text{cm}$ (微量比色皿光径) 进行计算即可。

注意事项:

1. 测定过程中样本和所有试剂在冰上放置, 以免变性和失活。
2. 最好两个人同时做此实验, 一个人比色, 一个人计时, 以保证实验结果的准确性。
3. 由于提取液含有蛋白成分 (约 1mg/mL), 故测定蛋白浓度时需要同时测定提取液的蛋白浓度。
4. 当样本 $\Delta A < 0.01$ 时, 可适当延长酶促反应时间或增大样本量后测定, 注意同步修改计算公式。
5. 当样本 $\Delta A > 1$ 或 $A > 1.5$ 时, 可将样本用提取液适当稀释后测定, 注意同步修改计算公式。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com