

甲基柠檬酸合酶（MCS）活性检测试剂盒（可见分光光度法）

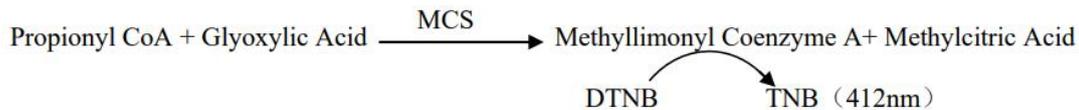
产品货号：BA2148

产品规格：50T/24S

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30mL×1瓶	-20℃
试剂一	液体0.3mL×1支	-20℃
试剂二	液体60mL×1瓶	2-8℃
试剂三	液体2.5mL×1瓶	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。
2. 试剂五：试剂放于棕色瓶内玻璃瓶中，临用前加入3mL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、1mL 玻璃比色皿、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. 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 412nm，用蒸馏水调零。
2. 试剂二置于 37℃水浴中预热 15min。
3. 操作表：在 1mL 玻璃比色皿或 1.5mL EP 管中分别加入（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)	对照管	测定管
试剂二	930	800
试剂三	35	35
试剂四	-	40
样本	35	35
试剂五	-	90

在 1mL 玻璃比色皿或 1.5mL EP 管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 1mL 玻璃比色皿或 1.5mL EP 管中分别加入（适用于测定微生物和植物组织样本）

试剂名称 (μL)	对照管	测定管
试剂二	765	635
试剂三	35	35
试剂四	-	40
样本	200	200
试剂五	-	90

在 1mL 玻璃比色皿或 1.5mL EP 管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 $\Delta A = (A2 \text{ 测定} - A1 \text{ 测定}) - (A2 \text{ 对照} - A1 \text{ 对照})$ 。

注：在 1.5mL EP 管中进行反应时，可参考以下步骤：先将比色皿置于分光光度计中，然后将反应液混匀后迅速加入 1mL 玻璃比色皿中，记录 412nm 下 10s 时的初始吸光度 A1 对照、A1 测定，之后迅速将反应液吸取到 1.5mL EP 管中，置于 37°C 水浴中准确反应 30min，迅速取出 EP 管并擦干，412nm 下记录 30min10s 时的吸光度 A2 对照、A2 测定。

三、甲基柠檬酸合酶 (MCS) 计算公式

1. 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。

$$\text{MCS 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 420.17 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{MCS 活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反} \div (\text{W} \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样}) \div T = 424.37 \times \Delta A \div \text{W}$$

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, 1cm; $V \text{ 反}$: 反应体系体积, 1mL; $V \text{ 样}$: 反应体系中加入的样本体积, 0.035mL; $V \text{ 提取}$: 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. 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。

$$\text{MCS 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反} \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 12.25 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$



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

(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。

$$\text{MCS 活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 12.38 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌/细胞计算:

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。

$$\text{MCS 活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反}} \div (N \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 12.38 \times \Delta A \div N$$

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, 1cm; $V_{\text{反}}$: 反应体系体积, 1mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入的样本体积, 0.2mL; $V_{\text{提取}}$: 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。

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