

苹果酸合酶（MS）活性检测试剂盒（微量法）

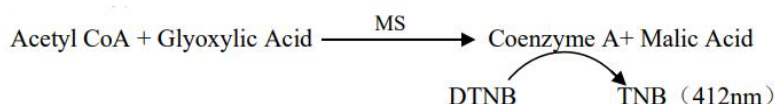
产品货号：BA2186

产品规格：100T/48S

产品简介：

苹果酸合酶（Malate Synthase, EC2.3.3.9）是属于转移酶中酰基转移酶的一类，主要存在于植物和微生物中。是乙醛酸循环的关键酶之一，在MS催化下乙醛酸与乙酰辅酶A反应生成苹果酸。

MS催化乙酰CoA和乙醛酸产生苹果酸，同时生成辅酶 A，辅酶A使无色的DTNB转变成黄色的TNB，在412nm处有特征吸收峰，据此可以计算MS活性。



注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体60mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体15mL×1瓶	2-8℃
试剂二	液体600μL×1支	2-8℃
试剂三	粉剂×1支	-20℃
试剂四	液体1.1mL×1支	2-8℃
试剂五	液体6mL×1瓶	2-8℃
试剂六	液体1.3mL×1支	2-8℃

溶液的配制：

1. 试剂三：临用前加入600μL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）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），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。
3. 培养上清等液体：直接检测，若有浑浊可以离心后取上清测定。

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. 试剂一 25℃预热 15min。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

3. 样本测定（在 1.5mL EP 管中加入下列试剂）

(1) 酶促反应

试剂名称 (μL)	对照管	测定管
试剂一	140	120
试剂二	-	10
试剂三	-	10
样本	50	50
充分混匀, 25°C反应 20min		
试剂四	10	10
充分混匀, 4°C 12000g 离心 5min, 取上清于 1.5mL EP 管/96 孔板中。		

(2) 显色反应

试剂名称 (μL)	对照管	测定管
上清液	140	140
试剂五	50	50
试剂六	10	10
充分混匀静置 5min, 测定 412nm 下的吸光度, 分别记为 A 对照、A 测定。 计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管需设一个对照管。		

三、苹果酸合酶 (MS) 计算公式

1. 使用微量比色皿测定:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 25°C下每 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。

MS 活性 (U/mg prot) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \div V_{\text{上清液}} \times V_{\text{酶促}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 21 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times F$

(2) 按样本质量计算:

酶活定义: 25°C下每 g 组织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。

MS 活性 (U/g 质量) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \div V_{\text{上清液}} \times V_{\text{酶促}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 21 \times \Delta A \div W \times F$

(3) 按细菌/细胞计算:

酶活定义: 25°C下每 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。

MS 活性 (U/ 10^6 cell) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \div V_{\text{上清液}} \times V_{\text{酶促}} \div (N \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 21 \times \Delta A \div N \times F$

(4) 按液体体积计算:

酶活定义: 25°C下每 mL 液体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。

MS 活性 (U/mL) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \div V_{\text{上清液}} \times V_{\text{酶促}} \div V_{\text{样}} \div T \times F = 21 \times \Delta A \div N \times F$

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; $V_{\text{显色}}$: 显色反应总体积, 0.2mL; $V_{\text{上清液}}$: 显色反应中上清液体积, 0.14mL; $V_{\text{酶促}}$: 酶促反应总体积, 0.2mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入的样本体积, 0.05mL; $V_{\text{提取}}$: 加入提取液的体积, 1mL; T : 反应时间, 20min; 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。

2. 使用 96 孔板测定:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 25°C下每 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。

MS 活性 (U/mg prot) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \div V_{\text{上清液}} \times V_{\text{酶促}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 35 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times F$

(2) 按样本质量计算:

酶活定义: 25°C下每 g 组织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。

MS 活性 (U/g 质量) = $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \div V_{\text{上清液}} \times V_{\text{酶促}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 35 \times \Delta A \div W \times F$



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

(3) 按细菌/细胞计算:

酶活定义: 25°C下每 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。

$$\text{MS 活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \div V_{\text{上清液}} \times V_{\text{酶促}} \div (N \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 35 \times \Delta A \div N \times F$$

(4) 按液体体积计算:

酶活定义: 25°C下每 mL 液体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。

$$\text{MS 活性 (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \div V_{\text{上清液}} \times V_{\text{酶促}} \div V_{\text{样}} \div T \times F = 35 \times \Delta A \div N \times F$$

ϵ : TNB 摩尔消光系数, $13.6 \times 10^{-3} \text{ mL}/(\text{nmol} \cdot \text{cm})$; d : 96 孔板光径, 0.6cm; $V_{\text{显色}}$: 显色反应总体积, 0.2mL; $V_{\text{上清液}}$: 加样表上清液体积, 0.14mL; $V_{\text{酶促}}$: 酶促反应总体积, 0.2mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入的样本体积, 0.05mL; $V_{\text{提取}}$: 加入提取液的体积, 1mL; T : 反应时间, 20min; 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. 若样本 $\Delta A < 0.01$, 可适当增大样本量重新提取或增大加样表样本体积(可同时降低试剂一体积保证总体积不变)后测定; 若样本 $\Delta A > 1.0$ 或 $A_{\text{测定}} > 1.5$, 可用蒸馏水稀释上清液后测定, 注意同步修改计算公式中的稀释倍数。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>