

## 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（methylel-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（10<sup>6</sup>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12000g，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

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

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。

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

$\epsilon$ ：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； $\text{Cpr}$ ：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。

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



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: 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。

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

$\epsilon$ : 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;  $C_{\text{pr}}$ : 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

**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>