

甲基柠檬酸合酶（methetyl-citrate synthase, MCS）试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

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；该反应促使无色的 DTNB 转变成黄色的 TNB，在 412nm 处有特征吸光值。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰、无水乙醇和蒸馏水

试剂组成和配制：

试剂一：液体 100mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂二：液体 20mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂三：液体 1.5mL×1 支，-20℃保存；

试剂四：液体 30mL×1 瓶，4℃保存；

试剂五：粉剂×1 瓶，4℃保存；

试剂六：粉剂×1 支，-20℃保存，临用前加入 1mL 蒸馏水，用不完的试剂仍-20℃保存；

样本的前处理：

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1mL 试剂一和 10uL 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- ② 将匀浆 600g，4℃离心 5min。
- ③ 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心 10min。
- ④ 上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的 CS（此步可选做）。
- ⑤ 在步骤④的沉淀中加入 200uL 试剂二和 2uL 试剂三，超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次），用于线粒体 CS 测定。

测定步骤：

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 412nm，蒸馏水调零。

2、样本测定

（1）在试剂五中加入 1mL 无水乙醇和 22mL 试剂四，混匀，37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 5min；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

（2）在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μL 样本、220 μL 试剂五和 10 μL 试剂六，混匀，记录 412nm 处 20 秒时的初始吸光度 A1 和 2 分 20 秒时的吸光度 A2，计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

MCS 活性计算:

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 880 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 177.8 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.3556 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 2.4×10^{-4} L; ϵ : TNB 摩尔消光系数, 1.36×10^4 L / mol /cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 mL; V 样总: 加入提取液体积, 0.202 mL; T: 反应时间, 2 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下:

(1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 1760 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 355.6 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.711 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 2.4×10^{-4} L; ϵ : TNB 摩尔消光系数, 1.36×10^4 L / mol /cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 mL; V 样总: 加入提取液体积, 0.202 mL; T: 反应时间, 2 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。

配方:

试剂一: 液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存; (50mM Tris-HCl 7.4, 8.56g 蔗糖, 88mg EDTA)

试剂二: 液体 20mL×1 瓶, 4℃ 保存; (10mM Tris-HCl 7.4, 1% Triton-100)

试剂三: 液体 1.5mL×1 支, 4℃ 保存; (100mM PMSF)

试剂四: 液体×1 瓶, 4℃ 保存; (称 0.135g Tris, 0.166g KCl, 8.4mg EDTA, 溶于 27.5mL 双蒸水, 用 HCl 调 pH 至 7.5)

试剂五: 粉剂×1 瓶, 4℃ 保存; (称取 2mg DTNB, 2mg 丙二酰 CoA 于 30mL 试剂瓶)

试剂六: 粉剂×1 支, -20℃ 保存; (称取 0.6mg 草酰乙酸于 1.5mLEP 管)