甲基柠檬酸合酶(MCS)活性检测试剂盒

中文名称 ： 甲基柠檬酸合酶(MCS)活性检测试剂盒

英文名称 ： MethylcitrateSynthase(MCS)ActivityAssayKit

储存条件 ： -20℃

产品包装 ： 盒装

检测方法 ： 微量法

有 效 期 ： 6 个月

产品规格 ： 100T/48S

产品组成 ：

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

溶液的配制：

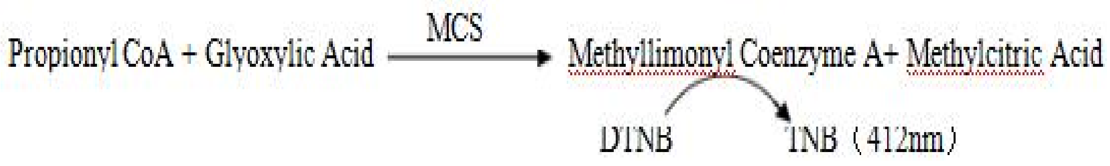
1、试剂四：临用前加入 0.5mL 蒸馏水充分溶解，未用完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融。

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。

产品说明:

甲基柠檬酸合酶（metheyl-citratesynthase，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。



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。

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)

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（10^6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）

试剂名称(μL)	**对照管**	**测定管**
试剂二	186	160
试剂三	7	7
试剂四	-	8
样本	7	7
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℃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ΔA=（A2 测定-A1 测定）-（A2 对照-A1 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)	**对照管**	**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℃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ΔA=（A2 测定-A1 测定）-（A2 对照-A1 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 1nmolTNB 定义为一个酶活力单

位。

MCS 活性(U/mgprot）=ΔA÷(ε×d)×V 反÷(Cpr×V 样)÷T=700.28×ΔA÷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 1nmolTNB 定义为一个酶活力单位。

MCS 活性(U/g 质量)=ΔA÷(ε×d）×V 反÷(W÷V 提取×V 样）÷T=707.28×ΔA÷W

ε：TNB 摩尔消光系数，13.6×10-3mL/(nmol·cm)；d：比色皿光径，0.6cm；V 反：反应体系体积，0.2mL；V 样：反应体系中加入的样本体积，0.007mL；V 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 1nmolTNB 定义为一个酶活力单位。

MCS 活性(U/mgprot)=ΔA÷(ε×d）×V 反÷(Cpr×V 样)÷T=20.42×ΔA÷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 1nmolTNB 定义为一个酶活力单位。

MCS 活性(U/g 质量)=ΔA÷(ε×d）×V 反÷(W÷V 提取×V 样)÷T=20.63×ΔA÷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 1nmolTNB 定义为一个酶活力单位。MCS 活性（U/10^6cell)=ΔA÷(ε×d)×V 反÷（N÷V 提取×V 样)÷T=20.63×ΔA÷N

ε：TNB 摩尔消光系数，13.6×10-3mL/(nmol·cm)；d：比色皿光径，0.6cm；V 反：反应体系体积，0.2mL；V 样：反应体系中加入的样本体积，0.040mL；V 提取：加入提取液及

试剂一的体积，1.01mL；T：反应时间，30min；Cpr：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=0.6cm 改为 d=1cm(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. 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ΔA＜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ΔA>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。

实验实例 ：

1、取 0.0918g 小鼠心脏加入 1mL 提取液和 10μL 试剂一进行冰浴匀浆，取上清用后，按照测定步骤操作，用 96 孔板测得ΔA=(A2 测定-A1 测定)-(A2 对照-A1 对照)=(0.665-0.349)-(0.261-0.251）=0.306，按样本质量计算 MCS 活性得：

MCS 活性（U/g 质量）=707.28×ΔA÷W=2357.60U/g 质量。

2、取 0.1186g 霉菌加入 1mL 提取液和 10μL 试剂一进行冰浴匀浆，取上清后按照测定步骤操作，用 96 孔板测得ΔA=(A2 测定-A1 测定）-(A2 对照-A1 对照）=(0.362-0.262)-(0.255-0.261）=0.106，按样本质量计算 MCS 活性得：

MCS 活性(U/g 质量）=20.63×ΔA÷W=18.72U/g 质量。

3、取 0.1013g 竹叶加入 1mL 提取液和 10μL 试剂一进行冰浴匀浆，取上清后按照测定步

骤操作，用 96 孔板测得ΔA=(A2 测定-A1 测定)-(A2 对照-A1 对照）=(0.291-0.252）-(0.261-0.249）=0.027，按样本质量计算 MCS 活性得：

MCS 活性(U/g 质量)=20.63×ΔA÷W=5.50U/g 质量。