

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

### 分光光度法

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。

#### 组成:

产品名称	KC012-10T/9S	KC012-25T/24S	KC012-50T/48S	Storage
试剂一: 液体	10ml	25ml	50ml	-20°C
试剂二: 液体	2ml	5ml	10ml	-20°C
试剂三: 液体	0.2ml	0.5ml	1ml	-20°C
试剂四: 液体	10ml	25ml	50ml	4°C
试剂五: 粉剂	1 支	1 支	2 支	4°C
试剂六: 粉剂	1 支	2 支	4 支	-20°C
试剂七: 粉剂	1 支	1 支	2 支	-20°C
说明书	一份			

KC012-10T/9S: 试剂五: 粉剂×1 支, 4°C保存, 临用前加入 320μl 无水乙醇; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融;

试剂六: 粉剂×1 支, -20°C保存, 临用前加入 320μl 蒸馏水; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融;

试剂七: 粉剂×1 支, -20°C保存, 临用前加入 320μl 蒸馏水; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融;

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 10μl 试剂三, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- ② 将匀浆 600g, 4°C离心 5min。
- ③ 弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4°C离心 10min。

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司

江苏省连云港市海州区花果山大道 17 号



服务热线: 0518-81263339

官网:<http://www.bio149.com>

- 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中的沉淀中加入 200 $\mu$ l 试剂二和 2 $\mu$ l 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。
- KC012-25T/24S：试剂五：粉剂 $\times$ 1 支，4 $^{\circ}$ C 保存，临用前加入 800 $\mu$ l 无水乙醇；用不完的试剂分装后-20 $^{\circ}$ C 保存，禁止反复冻融。
- 试剂六：粉剂 $\times$ 2 支，-20 $^{\circ}$ C 保存，临用前加入 400 $\mu$ l 蒸馏水；用不完的试剂分装后-20 $^{\circ}$ C 保存，禁止反复冻融。
- 试剂七：粉剂 $\times$ 1 支，-20 $^{\circ}$ C 保存，临用前加入 800 $\mu$ l 蒸馏水；用不完的试剂分装后-20 $^{\circ}$ C 保存，禁止反复冻融。
- KC012-50T/48S：试剂五：粉剂 $\times$ 2 支，4 $^{\circ}$ C 保存，临用前加入 800 $\mu$ l 无水乙醇；用不完的试剂分装后-20 $^{\circ}$ C 保存，禁止反复冻融。
- 试剂六：粉剂 $\times$ 4 支，-20 $^{\circ}$ C 保存，临用前加入 400 $\mu$ l 蒸馏水；用不完的试剂分装后-20 $^{\circ}$ C 保存，禁止反复冻融。
- 试剂七：粉剂 $\times$ 2 支，-20 $^{\circ}$ C 保存，临用前加入 800 $\mu$ l 蒸馏水；用不完的试剂分装后-20 $^{\circ}$ C 保存，禁止反复冻融。

### 自备仪器和用品：

可见分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1ml 玻璃比色皿、研钵、冰、无水乙醇和蒸馏水

### 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：

- ⑥ 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1ml 试剂一和 10 $\mu$ l 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- ⑦ 将匀浆 600g，4 $^{\circ}$ C 离心 5min。
- ⑧ 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4 $^{\circ}$ C 离心 10min。
- ⑨ 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）。
- ⑩ 在步骤④中的沉淀中加入 200 $\mu$ l 试剂二和 2 $\mu$ l 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、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 412nm，蒸馏水调零。
- 2、将试剂四、五、六和七在 37 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或 25 $^{\circ}$ C（其它物种）孵育 5min。
- 3、样本测定

试剂名称 ( $\mu$ l)	测定管
试剂四	780
试剂五	30
试剂六	30
样本	30
试剂七	30

将上述试剂按顺序加入 1 ml 玻璃比色皿中，加试剂七的同时开始计时，在 412nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1 和反应 2min 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利



## MCS 活性计算：

(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。

$$\text{MCS (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 1100 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{MCS (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 222.2 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{MCS (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.4444 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， $9 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：TNB 摩尔消光系数， $1.36 \times 10^4$  L / mol / cm； $d$ ：比色皿光径，1cm；

$V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.03 ml； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，0.202 ml； $T$ ：反应时间，2 min； $\text{Cpr}$ ：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。

