

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

微量法 100 管/96 样

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	KC013-100T/96S	Storage
试剂一: 液体	100ml	-20°C
试剂二: 液体	20ml	-20°C
试剂三: 液体	1.5ml	-20°C
试剂四: 液体	30ml	4°C
试剂五: 粉剂	1 瓶	4°C
试剂六: 粉剂	1 支	-20°C
说明书	一份	

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

自备仪器和用品:

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

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 10 μ l 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。
- 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)。

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



- ⑤ 在步骤④的沉淀中加入 200 μ l 试剂二和 2 μ 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 $^{\circ}$ C（哺乳动物）或 25 $^{\circ}$ C（其它物种）孵育 5min；用不完的试剂分装后-20 $^{\circ}$ C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 μ l 样本、220 μ l 试剂五和 10 μ l 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 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

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 $\times 10^4$ L； ϵ ：TNB 摩尔消光系数，1.36 $\times 10^4$ 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 $\times 10^4$ L； ϵ ：TNB 摩尔消光系数，1.36 $\times 10^4$ 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。

