



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: shyysw@sina.com

甲基柠檬酸合酶活性检测试剂盒(微量法)

货号: R42062

规格: 100T/96S

保质期: 6个月

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
试剂-A	100mL×1瓶	-20℃保存;
试剂-B	20mL×1瓶	-20℃保存;
试剂-C	1.5mL×1支	-20℃保存;
试剂-D	30mL×1瓶	4℃保存;
试剂-E	粉剂×1瓶	4℃保存;
试剂-F	粉剂×1支	-20℃保存, 临用前加入1mL蒸馏水, 剩余试剂-20℃保存

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

简介

意义: 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。

原理: 甲基柠檬酸合酶催化丙酰 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。

自备用品:

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-A 和 10uL 试剂-C, 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 中的沉淀中加入 200uL 试剂-B 和 2uL 试剂-C, 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. 在 试剂-E 中加入 1mL 无水乙醇和 22mL 试剂-D, 混匀, 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 孵育 5min; 剩余试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融;

3. 样本测定 (在微量石英比色皿或 96 孔板中加入)

试剂名称	测定管(μL)
样本	10
试剂-E	220
试剂-F	10
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 含量计算:

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。

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

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。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 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; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 0.202 mL; T : 反应时间, 2 min; C_{pr} : 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。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司: BCA Protein Assay Kit。

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。

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

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。

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

注: $V_{\text{反总}}$: 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; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 0.202 mL; T : 反应时间, 2 min; C_{pr} : 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。