



苹果酸合酶(MS)活性测定试剂盒-可见显色法

可见分光光度法

货号: R45043-24S

产品简介:

苹果酸合酶(MS, EC 2.3.3.9) 是乙醛酸循环的关键酶之一, 在细菌、真菌、原生动物以及萌发的植物种子中均有发现。

苹果酸合酶 (MS) 催化乙酰CoA 和乙醛酸生成苹果酸和CoA, 生成的CoA 具有还原性并可和DTNB 作用生成黄色物质, 该有色物质在412nm 处有特征吸收峰, 即可得出 MS 酶活性大小。反应式: $\text{acetyl-CoA} + \text{glyoxylate} + \text{H}_2\text{O} = (\text{S})\text{-malate} + \text{CoA}$

试剂盒组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体30mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	液体13mL×1瓶	4℃保存	
试剂二	粉体mg×1支	4℃保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加入1.1mL蒸馏水溶解备用。
试剂三	液体1mL×1支	4℃保存	
试剂四	液体0.5mL×1支	4℃保存	
标准品	粉剂mg×1支	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该试剂。

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径1cm)、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水

苹果酸合酶 (MS) 活性测定:

建议正式实验前选取2个样本做预测定, 了解本批样品和实验流程, 避免样本和试剂浪费!

1、样本制备:



①组织样本: 称取约0.1g 组织, 加入1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃离心15min, 取上清, 置冰上待测。

【注】:若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为1:5~10的比例提取

②细菌/细胞样本: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约500万细菌或细胞加入1mL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞(冰浴, 功率20%或200W, 超声 3s, 间隔10s, 重复30次);12000rpm 4℃离心15min, 取上清, 置冰上待测。

【注】:若增加样本量, 可按照细菌/细胞数量(10^4):提取液 (mL) 为500~1000:1的比例进行提取。

③液体样本: 直接检测; 若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

①可见分光光度计预热30min 以上, 调节波长至412nm, 蒸馏水调零。

②所有试剂解冻至室温(25℃), 或于水浴锅(25℃)中孵育15-30min;

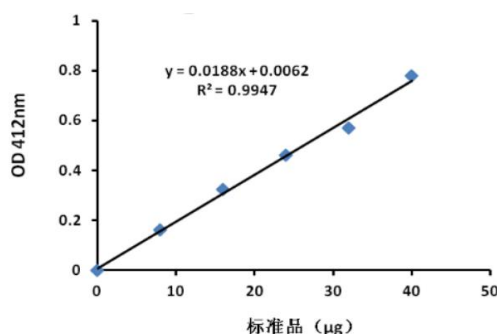
③试剂一和二和三可按照500:40:40比例配成混合液(一枪加580 μ L 该混合液)(该混合液用多少配多少, 现配现用)。

④在1mL玻璃比色皿(光径1cm)中依次加入:

试剂名称(μ L)	测定管
样本	200
试剂一	500
试剂二	40
试剂三	40
混匀, 30℃条件下孵育10min, 立即于412nm处读取吸光值A1	
试剂四	20
混匀, 30℃条件下反应30min, 立即于 412nm处读取吸光值A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0188x + 0.0062$, x 是标准品质量: μ g, y是 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 辅酶A 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{MS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A - 0.0062) \div 0.0188] \div (V1 \times Cpr) \div T \div Mr \times 10^3 \\ &= 23.1 \times (\Delta A - 0.0062) \div Cpr \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织每分钟催化产生 1nmol 辅酶A 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{MS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A - 0.0062) \div 0.0188] \div (W \times V1 \div V) \div T \div Mr \times 10^3 \\ &= 23.1 \times (\Delta A - 0.0062) \div W \end{aligned}$$

4、按细菌或细胞密度计算:

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

$$\begin{aligned} \text{MS}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A - 0.0062) \div 0.0188] \div (500 \times V1 \div V) \div T \div Mr \times 10^3 \\ &= 0.046 \times (\Delta A - 0.0062) \end{aligned}$$

5、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟催化产生 1nmol 辅酶A 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{MS}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) &= [(\Delta A - 0.0062) \div 0.0188] \div V1 \div T \div Mr \times 10^3 \\ &= 23.1 \times (\Delta A - 0.0062) \end{aligned}$$

V1--- 加入样本体积, 0.2mL;

V---加入提取液体积, 1mL;

T---反应时间, 15min;



W---样本质量, g;

CoA---Mr 分子量, 767.5;

50---细胞或细菌总数, 万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的BCA蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1.制备标准品母液(2mg/mL): 用0.5mL 蒸馏水溶解标准品(母液需在两天内用且-20℃ 保存)。
- 2.把母液稀释成六个浓度梯度的标准品: 0,0.04,0.08,0.12,0.16,0.2 mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3.依据以下步骤操作, 50 μ L 标准品+130 μ L 试剂一+20 μ L 试剂三, 根据结果即可制作标准曲线。



源叶