



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°C

产品包装：盒装

检测方法：可见分光光度法

有效期：6个月

产品规格：50T/24S

产品组成：

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 30mL×1 瓶	-20°C保存
试剂一	液体 0.3mL×1 支	-20°C保存
试剂二	液体 60mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂三	液体 2.5mL×1 支	2-8°C保存
试剂四	粉剂×1 支	-20°C保存
试剂五	粉剂×1 瓶	-20°C保存

溶液的配制：

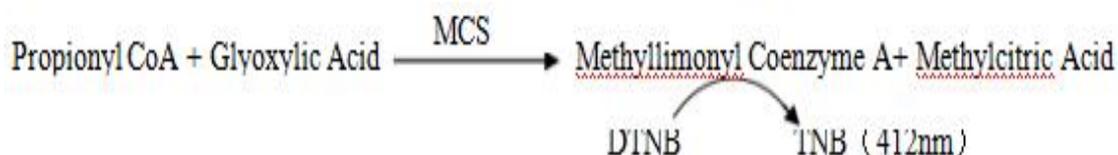
- 1、试剂四：临用前加入 1.5mL 蒸馏水充分溶解，未用完的试剂-20°C分装保存 4 周，避免反复冻融。
- 2、试剂五：试剂放于棕色瓶内玻璃瓶中，临用前加入 3mL 蒸馏水充分溶解，未用完的试剂-20°C分装保存 4 周，避免反复冻融。



产品说明:

甲基柠檬酸合酶 (methelyl-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; 该反应促使无色的 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、1mL 玻璃比色皿、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 10 μ L 试剂一, 进行冰浴匀浆。12000g, 4 $^{\circ}$ C 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 10 μ L 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°C离心 10min, 取上清置于冰上待测。

二、测定步骤

- 1、可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 412nm, 蒸馏水调零。
- 2、试剂二置于 37°C水浴中预热 15min。
- 3、操作表: 在 1mL 玻璃比色皿或 1.5mLEP 管中分别加入 (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	930	800
试剂三	35	35
试剂四	-	40
样本	35	35
试剂五	-	90

在 1mL 玻璃比色皿或 1.5mLEP 管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°C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 $\Delta A = (A2 \text{ 测定} - A1 \text{ 测定}) - (A2 \text{ 对照} - A1 \text{ 对照})$ 。

- 4、操作表: 在 1mL 玻璃比色皿或 1.5mLEP 管中分别加入(适用于测定微生物和植物组织样本)

试剂名称(μL)	对照管	测定管
试剂二	765	635
试剂三	35	35
试剂四	-	40
样本	200	200
试剂五	-	90

在 1mL 玻璃比色皿或 1.5mLEP 管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°C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 $\Delta A = (A2 \text{ 测定} - A1 \text{ 测定}) - (A2 \text{ 对照} - A1 \text{ 对照})$ 。

注: 在 1.5mLEP 管中进行反应时, 可参考以下步骤: 先将比色皿置于分光光度计中, 然后将反应液混匀后迅速加入 1mL 玻璃比色皿中, 记录 412nm 下 10s 时的初始吸光度 A1 对照、A1 测定, 之后迅速将反应液吸取到 1.5mLEP 管中, 置于 37°C水浴中准确反应 30min,



迅速取出 EP 管并擦干, 412nm 下记录 30min10s 时的吸光度 A2 对照、A2 测定。

三、甲基柠檬酸合酶(MCS)计算公式

1. 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。

$$\text{MCS 活性(U/mgprot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 420.17 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{MCS 活性(U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 424.37 \times \Delta A \div W$$

ϵ : TNB 摩尔消光系数, $13.6 \times 10^{-3} \text{ mL}/(\text{nmol} \cdot \text{cm})$; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反}}$: 反应体系体积, 1mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入的样本体积, 0.035mL; $V_{\text{提取}}$: 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. 微生物和植物组织样本:

(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。

$$\text{MCS 活性(U/mgprot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反}} \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 12.25 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{MCS 活性(U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 12.38 \times \Delta A \div W$$



(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/ 10^6 cell)= $\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{反} \div (N \div V_{提取} \times V_{样}) \div T = 12.38 \times \Delta A \div N$

ϵ : TNB 摩尔消光系数, $13.6 \times 10^{-3} \text{mL}/(\text{nmol} \cdot \text{cm})$; d: 比色皿光径, 1cm; $V_{反}$: 反应体系体积, 1mL; $V_{样}$: 反应体系中加入的样本体积, 0.2mL; $V_{提取}$: 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。

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 $\Delta A < 0.01$ 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 $\Delta A > 1$ 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 10 μ L 试剂一进行冰浴匀浆, 取上清用后按照测定步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得 $\Delta A = (A_2 \text{ 测定} - A_1 \text{ 测定}) - (A_2 \text{ 对照} - A_1 \text{ 对照}) = (0.930 - 0.339) - (0.333 - 0.294) = 0.552$, 按样本质量计算 MCS 活性得:

MCS 活性(U/g 质量) = $424.37 \times \Delta A \div W = 2551.76 \text{U/g 质量}$ 。

2、取 0.1186g 霉菌加入 1mL 提取液和 10 μ L 试剂一进行冰浴匀浆, 取上清后按照测定步



骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得 $\Delta A=(A_2 \text{ 测定}-A_1 \text{ 测定})-(A_2 \text{ 对照}-A_1 \text{ 对照})$

$=(0.536-0.396)-(0.357-0.376)=0.159$, 按样本质量计算 MCS 活性得:

MCS 活性 (U/g 质量) $=12.38 \times \Delta A \div W = 16.60$ U/g 质量。

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

步骤操作, 用 1mL 玻璃比色皿测得 $\Delta A=(A_2 \text{ 测定}-A_1 \text{ 测定})-(A_2 \text{ 对照}-A_1 \text{ 对照})$

$=(0.477-0.413)-(0.411-0.403)=0.056$,按样本质量计算 MCS 活性得:

MCS 活性(U/g 质量) $=12.38 \times \Delta A \div W = 6.844$ U/g 质量。