

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S1004

Size: 50T/48S

苹果酸合酶 (MS) 检测试剂盒说明书

可见分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

苹果酸合酶 (MS, EC 4.1.3.2) 是属于转移酶中酰基转移酶的一类, 主要存在于植物和微生物中。MS 是乙醛酸循环的关键酶之一, 在 MS 催化下乙醛酸与乙酰辅酶 A 反应生成苹果酸。

二、测定原理:

MS 催化乙酰 CoA 和乙醛酸产生苹果酸, 同时生成辅酶 A, 辅酶 A 使无色的 DTNB 转变成黄色的 TNB, 在 412nm 处有特征吸光值。

三、需自备的仪器和用品:

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、和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 100mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂二	液体 25mL × 1 瓶	4°C 保存	
试剂三	粉剂 × 1 瓶	-20°C 保存	临用前加入 25mL 试剂一充分溶解后使用, 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融;
试剂四	粉剂 × 1 瓶	4°C 保存	临用前加入 6 mL 试剂一充分溶解后使用, 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融

			融;
--	--	--	----

五、样本的前处理:

1、细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 试剂一体积 (mL) 为 500~1000 : 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一), 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); 8000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、组织: 按照组织质量 (g): 试剂一体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 试剂一), 进行冰浴匀浆, 8000g 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

六、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、样本测定

在 1mL 玻璃比色皿中依次加入 100 μL 样本、400 μL 试剂二, 400 μL 试剂三和 100 μL 试剂四, 混匀, 立即记录 412nm 处反应 5min 时的吸光值 A_1 和 10min 时的吸光值 A_2 , 计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

七、MS 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 1nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

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

$$= 147 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

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

$$=147 \times \Delta A \div W$$

(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 1nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

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

$$=0.294 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $1 \times 10^{-3} \text{L}$; ϵ : TNB 摩尔消光系数, $1.36 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$;
 d : 比色光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.1mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 5min; 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。