

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-S1005

Size: 100T/96S

苹果酸合酶（MS）检测试剂盒说明书

微量法

*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：

酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、96 孔板、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 120 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 10 mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存	临用前加入 10mL 试剂一充分溶解后使用，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；
试剂四	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 2.4mL 试剂一充分溶解后使用，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

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℃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℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

六、测定步骤:

1、酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 412nm。

2、样本测定

在 96 孔板中依次加入 20 μ L 样本、80 μ L 试剂二, 80 μ L 试剂三和 20 μ L 试剂四, 混匀, 立即记录 412nm 处反应 5min 时的吸光值 A1 和 10min 时的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

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。

$$\text{MS (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$
$$= 294 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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。

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

$$=294 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{MS (nmol/min / } 10^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$=0.588 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $2 \times 10^{-4}\text{L}$; ϵ : TNB 摩尔消光系数, $1.36 \times 10^4\text{L} / \text{mol} / \text{cm}$;
 d : 96 孔板光径, 0.5cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL;
 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。