

甲基柠檬酸合酶（MCS）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC5865

规格：100T/48S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	-20℃保存
试剂一	液体 0.6mL×1 支	-20℃保存
试剂二	液体 20mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	液体 1mL×1 支	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂五	粉剂×1 支	-20℃保存

溶液的配制：

- 1、试剂四：临用前加入 0.5mL 蒸馏水充分溶解，未用完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融。
- 2、试剂五：临用前加入 1.5mL 蒸馏水充分溶解，未用完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融。

产品说明：

甲基柠檬酸合酶（methyl-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。

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。

需自备的仪器和用品：

可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿/96孔板、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，具体比例可以参考文献）

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 10μL 试剂一，进行冰浴匀浆。12000g，4℃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（10⁶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 10μL 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 12000 g，4℃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/酶标仪预热30min以上，调节波长至412nm，分光光度计用蒸馏水调零。

2、试剂二置于37°C水浴中预热15min。

3、操作表：在微量比色皿/96孔板中依次加入（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	186	160
试剂三	7	7
试剂四	-	8
样本	7	7
试剂五	-	18

在微量比色皿/96孔板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：在微量比色皿/96孔板中分别加入（适用于测定微生物及植物组织样本）

试剂名称（μL）	对照管	测定管
试剂二	153	127
试剂三	7	7
试剂四	-	8
样本	40	40
试剂五	-	18

在微量比色皿/96孔板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 $\Delta A = (A2 \text{ 测定} - A1 \text{ 测定}) - (A2 \text{ 对照} - A1 \text{ 对照})$ 。

三、甲基柠檬酸合酶（MCS）计算公式

1. 使用96孔板测定（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1nmol TNB定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 700.28 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

（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1nmol TNB定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 707.28 \times \Delta A \div W$$

ϵ : TNB摩尔消光系数, $13.6 \times 10^{-3} \text{ mL}/(\text{nmol} \cdot \text{cm})$; d : 96孔板光径, 0.6cm; $V_{\text{反}}$: 反应体系体积, 0.2mL; $V_{\text{样}}$: 反应体系中加入的样本体积, 0.007mL; $V_{\text{提取}}$: 加入提取液及试剂一的体积, 1.01mL; T : 反应时间, 5min; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; W : 样本质量, g。

2. 使用96孔板测定（微生物及植物组织样本）：

（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1nmol TNB定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 20.42 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

（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1nmol TNB定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 20.63 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌/细胞计算：

酶活定义：每10⁶个细菌/细胞在反应体系中每分钟催化产生1nmol TNB定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反}} \div (N \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T = 20.63 \times \Delta A \div N$$

ϵ ：TNB摩尔消光系数，13.6×10⁻³ mL/(nmol·cm)； d ：比色皿光径，0.6cm； $V_{\text{反}}$ ：反应体系体积，0.2mL； $V_{\text{样}}$ ：反应体系中加入的样本体积，0.040mL； $V_{\text{提取}}$ ：加入提取液及试剂一的体积，1.01mL； T ：反应时间，30min； C_{pr} ：样本蛋白浓度，mg/mL； W ：样本质量，g； N ：细菌或细胞总数，以10⁶计。

3. 使用微量比色皿测定：

将上述公式中的 $d=0.6\text{cm}$ 改为 $d=1\text{cm}$ （微量比色皿光径）进行计算即可。

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. 最好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 96 孔板测得 $\Delta A = (A_2 \text{ 测定} - A_1 \text{ 测定}) - (A_2 \text{ 对照} - A_1 \text{ 对照}) = (0.665 - 0.349) - (0.261 - 0.251) = 0.306$ ，按样本质量计算 MCS 活性得：

$$\text{MCS 活性 (U/g 质量)} = 707.28 \times \Delta A \div W = 2357.60 \text{ U/g 质量。}$$

- 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 96 孔板测得 $\Delta A = (A_2 \text{ 测定} - A_1 \text{ 测定}) - (A_2 \text{ 对照} - A_1 \text{ 对照}) = (0.362 - 0.262) - (0.255 - 0.261) = 0.106$ ，按样本质量计算 MCS 活性得：

$$\text{MCS 活性 (U/g 质量)} = 20.63 \times \Delta A \div W = 18.72 \text{ U/g 质量。}$$

- 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 96 孔板测得 $\Delta A = (A_2 \text{ 测定} - A_1 \text{ 测定}) - (A_2 \text{ 对照} - A_1 \text{ 对照}) = (0.291 - 0.252) - (0.261 - 0.249) = 0.027$ ，按样本质量计算 MCS 活性得：

$$\text{MCS 活性 (U/g 质量)} = 20.63 \times \Delta A \div W = 5.50 \text{ U/g 质量。}$$

参考文献：

[1] Maerker, C, et al. "Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus*. Propionyl-CoA affects polyketide synthesis, growth and morphology of conidia. " *Febs Journal* 272.14(2010):3615-3630.

[2] Watson, D., Lindel, D.L. & Fall, R. *Pseudomonas aeruginosa* contains an inducible methylcitrate synthase. *Current Microbiology* 8, 17-21 (1983).

相关系列产品：





BC0380/BC0385 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 活性检测试剂盒
BC1060/BC1065 柠檬酸合酶 (CS) 活性检测试剂盒
BC6020/BC6025 乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 活性检测试剂盒 (酶法)

