

苹果酸合酶 (malate synthase, MS) 试剂盒说明书

(货号: G0883W 微板法 48 样)

一、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 具有还原性并可与 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: $\text{acetyl-CoA} + \text{glyoxylate} + \text{H}_2\text{O} = (\text{S})\text{-malate} + \text{CoA}$

二、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 60mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 6mL×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。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水

四、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 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 412nm。

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 100:20:20 比例配成混合液 (一枪加 140μL 该混合液) (该混合液用多少配多少, 现配现用)。

④ 在 96 孔板中依次加入:

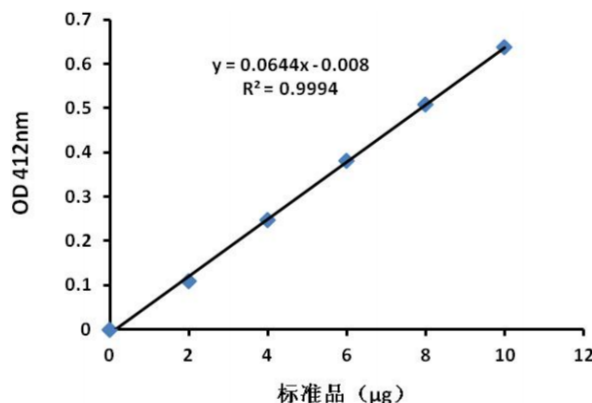
试剂名称 (μL)	测定管
样本	50
试剂一	100
试剂二	20
试剂三	20
混匀, 30℃条件下孵育 10min, 立即于	

412nm 处读取吸光值 A1,	
试剂四	10
混匀, 30°C条件下反应 30min, 立即于 412nm 处读取吸光值 A2, $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【注】: 若 ΔA 小于 0.01, 可以延长反应时间 T (如: 30°C条件下孵育 60min 或更长), 或增加样本量 V1 (如增至 100 μ L, 则试剂一相应减少)。调整后的 T 或 V1 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.0644x - 0.008$, 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。

$$MS(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.008) \div 0.0644] \div (V1 \times Cpr) \div T \div Mr \times 10^3 = 13.5 \times (\Delta A + 0.008) \div Cpr$$

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。

$$MS(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.008) \div 0.0644] \div (W \times V1 \div V) \div T \div Mr \times 10^3 = 13.5 \times (\Delta A + 0.008) \div W$$

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 1 nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$MS(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.008) \div 0.0644] \div (500 \times V1 \div V) \div T \div Mr \times 10^3 = 0.027 \times (\Delta A + 0.008)$$

5、按液体体积计算:

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

$$MS(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.008) \div 0.0644] \div V1 \div T \div Mr \times 10^3 = 13.5 \times (\Delta A + 0.008)$$

V1---加入样本体积, 0.05mL; V---加入提取液体积, 1mL; T---反应时间, 30min;

W---样本质量, g;

CoA---Mr 分子量, 767.5; 500---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°C 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。
- 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。