



甲基柠檬酸合酶 (MCS) 活性检测试剂盒

Metheyl Citrate Synthase (MCS) Activity Assay Kit

Oxaloacetate+Propionyl CoA



Metheyl Citrate Synthase (MCS)

Methylcitric Acid+Methyllimonyl CoA



DTNB

TNB

北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



甲基柠檬酸合酶（MCS）活性检测试剂盒

Methetyl Citrate Synthase (MCS) Activity Assay Kit

一、产品描述

甲基柠檬酸合酶广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞的线粒体基质中，主要参与柠檬酸循环中异戊二酸的代谢过程，可催化异戊二酸和乙酰辅酶 A 生成甲基柠檬酸，为细胞提供能量和代谢中间产物，并与柠檬酸合酶共同参与三羧酸循环的调节，对代谢工程、植物生理学研究以及疾病诊断等研究具有重要意义。

甲基柠檬酸合酶可催化丙酰 CoA 和草酰乙酸生成甲基柠檬酰辅酶 A，进一步水解生成甲基柠檬酸，并促使无色的 DTNB 转变成黄色的 TNB，产物在 412 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征甲基柠檬酸合酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 100 mL×1 瓶	-20°C保存	-
试剂二	液体 20 mL×1 瓶	-20°C保存	-
试剂三	液体 1.5 mL×1 支	-20°C保存	-
试剂四	液体 30 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂五	粉剂×1 瓶	4°C保存	使用前加入 1 mL 无水乙醇充分溶解 再加入 22 mL 试剂四充分混匀 (分装后-20°C可保存 1 个月，避免反复冻融)
试剂六	粉剂×1 支	-20°C保存	使用前加入 1 mL 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月，避免反复冻融)

需自备试剂：无水乙醇（C₂H₆O，MW=46.07，CAS:64-17-5）；

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：可见分光光度计/酶标仪、微量玻璃比色皿（光径 10 mm）/96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备（可根据预实验结果适当调整样本量及比例）

- ①称取 100 mg 组织或收集 500 万细胞，加入 1 mL 试剂一和 10 μ L 试剂三，使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆，匀浆液 4℃ 600 g 离心 10 min，弃沉淀，留上清；
- ②吸取步骤①离心后上清液至另一离心管中，4℃ 12000 g 离心 10 min；
- ③步骤②离心后上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的 MCS 活性（此步可选做）；
- ④步骤②离心后沉淀中加入 200 μ L 试剂二和 2 μ L 试剂三，冰浴超声破碎（功率 20%或 200 W，超声 5 s，间隔 10 s，重复 30 次）即为**粗酶液**，用于测定线粒体甲基柠檬酸合酶活性。

2.测定步骤

- ①分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 412 nm，蒸馏水调零。
- ②试验前将**试剂五** 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）预热 5 min。
- ③在 96 孔板或微量玻璃比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μ L)
粗酶液	10
试剂五	220
试剂六	10

- 吸光值测定：**①充分混匀并立即开始计时，测定 20 s 时（总时间）412 nm 处吸光值，记为 A1；
②准确反应 120 s，测定 140 s（总时间）时 412 nm 处吸光值，记为 A2；③计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

3.甲基柠檬酸合酶（MCS）活性计算

3.1 使用 96 孔板测定的计算公式

- ①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1764.71 \times \Delta A}{C_{\text{pr}}}$$

- ②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织样本每分钟生成 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{356.47 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS (U/10}^4\text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{356.47 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

3.2 使用微量玻璃比色皿测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{882.35 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织样本每分钟生成 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{178.24 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MCS (U/10}^4\text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{178.24 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.01 mL；V 样总：粗酶液总体积，0.202 mL；V 反总：反应体系总体积， 2.4×10^{-4} L； ϵ ：TNB 摩尔消光系数， 1.36×10^4 L/mol/cm； d_1 ：96 孔板光径，0.5 cm； d_2 ：微量玻璃比色皿光径，1 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间：2 min； 10^9 ：单位换算系数，1 mol = 10^9 nmol。

四、注意事项

①准确在相应时间点完成吸光值测定，以确保实验结果的准确性和重复性；若使用酶标仪需使用多道移液器且分批进行检测，以确保组间反应时间一致；

②为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

