

# 苹果酸合酶（MS）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：AC17976

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，有疑问请及时联系工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 60 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 15 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 600 μL×1 支	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂四	液体 1.1 mL×1 支	2-8℃保存
试剂五	液体 6 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂六	液体 1.3 mL×1 支	2-8℃保存

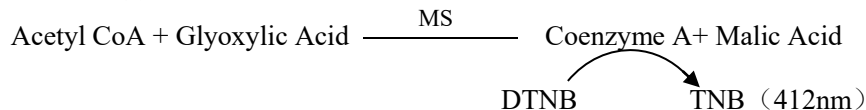
溶液的配制：

- 1、试剂三：临用前加入 600μL 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：

苹果酸合酶（Malate Synthase, EC2.3.3.9）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。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。

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处有特征吸收峰，据此可以计算MS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。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

## 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）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（10<sup>6</sup>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），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。

3. 培养上清等液体：直接检测，若有浑浊可以离心后取上清测定。

## 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、试剂一25℃预热15min。

3、样本测定（在1.5mL EP管中加入下列试剂）

### (1) 酶促反应

试剂名称 (μL)	对照管	测定管
试剂一	140	120
试剂二	-	10
试剂三	-	10
样本	50	50
充分混匀，25℃反应20min		
试剂四	10	10
充分混匀，4℃ 12000g离心5min，取上清于1.5mL EP管/96孔板中。		

### (2) 显色反应

试剂名称 (μL)	对照管	测定管
上清液	140	140
试剂五	50	50
试剂六	10	10
充分混匀静置5min，测定412nm下的吸光度，分别记为A对照、A测定。计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管需设一个对照管。		

## 三、苹果酸合酶（MS）计算公式

### 1. 使用微量比色皿测定：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：25℃下每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。

$$\text{MS活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \div V_{\text{上清液}} \times V_{\text{酶促}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 21 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times F$$

(2) 按样本质量计算：

酶活定义：25℃下每g组织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。

$$\text{MS活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \div V_{\text{上清液}} \times V_{\text{酶促}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 21 \times \Delta A \div W \times F$$

(3) 按细菌/细胞计算：

酶活定义：25℃下每 $10^6$ 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。

$$\text{MS活性 (U}/10^6 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \div V_{\text{上清液}} \times V_{\text{酶促}} \div (N \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 21 \times \Delta A \div N \times F$$

(4) 按液体体积计算：

酶活定义：25℃下每mL液体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。

$$\text{MS活性 (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \div V_{\text{上清液}} \times V_{\text{酶促}} \div V_{\text{样}} \div T \times F = 21 \times \Delta A \div N \times F$$

$\epsilon$ : TNB摩尔消光系数,  $13.6 \times 10^3 \text{ mL}/(\text{nmol} \cdot \text{cm})$ ; d: 比色皿光径, 1cm; V显色: 显色反应总体积, 0.2mL; V上清液: 显色反应中上清液体积, 0.14mL; V酶促: 酶促反应总体积, 0.2mL; V样: 反应体系中加入的样本体

积, 0.05mL; V提取: 加入提取液的体积, 1mL; T: 反应时间, 20min; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; N: 细菌或细胞总数, 以10<sup>6</sup>计。

## 2. 使用96孔板测定:

### (1) 按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 25°C下每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。

$$\text{MS活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \div V_{\text{上清液}} \times V_{\text{酶促}} \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 35 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times F$$

### (2) 按样本质量计算:

酶活定义: 25°C下每g组织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。

$$\text{MS活性 (U/g 质量)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \div V_{\text{上清液}} \times V_{\text{酶促}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 35 \times \Delta A \div W \times F$$

### (3) 按细菌/细胞计算:

酶活定义: 25°C下每10<sup>6</sup>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。

$$\text{MS活性 (U/10}^6 \text{ cell)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \div V_{\text{上清液}} \times V_{\text{酶促}} \div (N \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 35 \times \Delta A \div N \times F$$

### (4) 按液体体积计算:

酶活定义: 25°C下每mL液体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。

$$\text{MS活性 (U/mL)} = \Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{显色}} \div V_{\text{上清液}} \times V_{\text{酶促}} \div V_{\text{样}} \div T \times F = 35 \times \Delta A \div N \times F$$

$\epsilon$ : 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显色: 显色反应总体积, 0.2mL; V上清液: 加样表上清液体积, 0.14mL; V酶促: 酶促反应总体积, 0.2mL; V样: 反应体系中加入的样本体积, 0.05mL; V提取: 加入提取液的体积, 1mL; T: 反应时间, 20min; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; N: 细菌或细胞总数, 以10<sup>6</sup>计。

## 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. 若样本  $\Delta A < 0.01$ , 可适当增大样本量重新提取或增大加样表样本体积 (可同时降低试剂一体积保证总体积不变) 后测定; 若样本  $\Delta A > 1.0$  或 A 测定  $> 1.5$ , 可用蒸馏水稀释上清液后测定, 注意同步修改计算公式中的稀释倍数。

## 实验实例:

- 1、取 0.1141g 霉菌加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆, 取上清后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得  $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.247 - 0.206 = 0.041$ , 按样本质量计算 MS 活性得:  
MS 活性 (U/g 质量) =  $35 \times \Delta A \div W \times F = 12.577 \text{ U/g 质量}$ 。
- 2、取 0.1169g 萌芽的绿豆加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆, 取上清后用蒸馏水稀释 2 倍后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得  $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.406 - 0.244 = 0.162$ , 按样本质量计算 MS 活性得:  
MS 活性 (U/g 质量) =  $35 \times \Delta A \div W \times F = 97.006 \text{ U/g 质量}$ 。
- 3、取 0.1102g 芒果加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆, 取上清后按照测定步骤操作, 用 96 孔板测得  $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}} = 0.341 - 0.153 = 0.188$ , 按样本质量计算 MS 活性得:  
MS 活性 (U/g 质量) =  $35 \times \Delta A \div W \times F = 97.710 \text{ U/g 质量}$ 。

#### 参考文献:

[1] Roucourt B, Minnebo N, Augustijns P, Hertveldt K, Volckaert G, Lavigne R. Biochemical characterization of malate synthase G of *P. aeruginosa*. *BMC Biochem.* 2009 Jun 24;10:20.

[2] Miernyk JA, Trelease RN, Choinski JS. Malate synthase activity in cotton and other ungerminated oilseeds: a survey. *Plant Physiol.* 1979 Jun;63(6):1068-71.

#### 相关系列产品:

AC10230/AC10231 NAD-苹果酸脱氢酶 (NAD-MDH) 活性检测试剂盒

AC10246/AC10247 NADP-苹果酸酶 (NADP-ME) 活性检测试剂盒

AC17824/AC17879 苹果酸含量检测试剂盒