

甲基柠檬酸合酶（MCS）检测试剂盒（分光光度法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

测定意义：

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。

测定原理：

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；该反应促使无色的 DTNB 转变成黄色的 TNB，在 412nm 处有特征吸光值。

试剂组成和配制：

试剂一：液体 10mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂二：液体 2mL×1 瓶，-20℃ 保存；

试剂三：液体 0.2mL×1 支，-20℃ 保存；

试剂四：液体 10mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂五：粉剂×1 支，4℃ 保存，临用前加入 320μL 无水乙醇；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融；

试剂六：粉剂×1 支，-20℃ 保存，临用前加入 320μL 蒸馏水；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融；

试剂七：粉剂×1 支，-20℃ 保存，临用前加入 320μL 蒸馏水；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融；

样本的前处理：

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞，加入 1mL 试剂一和 10uL 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- ② 将匀浆 600g，4℃ 离心 5min。
- ③ 弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃ 离心 10min。
- ④ 上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的 CS（此步可选做）。
- ⑤ 在步骤④中的沉淀中加入 200uL 试剂二和 2uL 试剂三，超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3 秒，间隔 10 秒，重复 30 次），用于线粒体 CS 测定。

测定步骤:

- 1、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 412nm，蒸馏水调零。
- 2、将试剂四、五、六和七在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 5min。
- 3、样本测定

| 试剂名称 (μL) | 测定管 |
|-----------|-----|
| 试剂四 | 780 |
| 试剂五 | 30 |
| 试剂六 | 30 |
| 样本 | 30 |
| 试剂七 | 30 |

将上述试剂按顺序加入 1 mL 玻璃比色皿中，加试剂七的同时开始计时，在 412nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1 和反应 2min 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

MCS 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 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{MCS (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 1100 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{MCS (nmol/min/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 222.2 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

- (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 1 nmol TNB 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{MCS (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.4444 \times \Delta A \end{aligned}$$

V 反总：反应体系总体积， 9×10^{-4} L;

ϵ ：TNB 摩尔消光系数， 1.36×10^4 L / mol / cm;

d：比色皿光径，1cm;

V 样：加入样本体积，0.03 mL;

V 样总：加入提取液体积，0.202 mL;

T：反应时间，2 min;

Cpr：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。