

苹果酸合酶(malate synthase, MS)试剂盒

分光光度法 50 管/48 样

注 意：正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测

测定意义：

苹果酸合酶（MS，EC 4.1.3.2）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。MS 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。

测定原理：

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 处有特征吸光值。

需自备的仪器和用品：

分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰、和蒸馏水

试剂组成和配制：

试剂一：液体 100 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 25 mL×1 瓶，4℃保存；

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃保存；临用前加入 25mL 试剂一充分溶解后使用，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

试剂四：粉剂×1 瓶，4℃保存；临用前加入 6 mL 试剂一充分溶解后使用，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

样本的前处理：

1、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（10⁴ 个）：试剂一体积（mL）为 500~1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一），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）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、组织：按照组织质量（g）：试剂一体积(mL)为 1：5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一），进行冰浴匀浆，8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

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、样本测定

在 1mL 玻璃比色皿中依次加入 100 μL 样本、400 μL 试剂二，400 μL 试剂三和 100 μL 试剂四，混匀，立即记录 412 nm 处反应 5min 时的吸光值 A1 和 10min 时的吸光值 A2，计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

MS 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。MS (nmol/min /mg prot)
$$= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 147 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{MS (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 147 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{MS (nmol/min /104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.294 \times \Delta A \times V_{\text{反总}}$$

反总: 反应体系总体积, 1×10^{-3} L; ϵ : TNB 摩尔消光系数, 1.36×10^4 L / mol /cm; d: 比色光径, 1 cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.1 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 5 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。