

苹果酸合酶 (malate synthase, MS) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

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:

酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰、和蒸馏水

试剂组成和配制:

试剂一: 液体 120 mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 液体 10 mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂三: 粉剂×1 瓶, -20℃ 保存; 临用前加入 10mL 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 2.4mL 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、酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 412nm。

2、样本测定

在 96 孔板中依次加入 20 μL 样本、80 μL 试剂二, 80 μL 试剂三和 20 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。

$$MS \text{ (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times C_{pr}) \div T = 294 \times \Delta A \div C_{pr}$$

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。

$$MS \text{ (nmol/min /g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 294 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$MS \text{ (nmol/min /10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 0.588 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : TNB 摩尔消光系数, 1.36×10^4 L / mol /cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.02 mL; V 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。