

## Malate Synthase Activity Kit

### 苹果酸合酶（MS）试剂盒说明书

货号:BN72413 | 方法: 微板法 | 规格: 48 样

#### 一、产品简介:

苹果酸合酶（MS，EC 2.3.3.9）是乙醛酸循环的关键酶之一，在细菌、真菌、原生动物以及萌发的植物种子中均有发现。

苹果酸合酶（MS）催化乙酰 CoA 和乙醛酸生成苹果酸和 CoA，生成的 CoA 具有还原性并可与 DTNB 作用生成黄色物质，该有色物质在 412nm 处有特征吸收峰，即可得出 MS 酶活性大小。反应式： $\text{acetyl-CoA} + \text{glyoxylate} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow (\text{S})\text{-malate} + \text{CoA}$

#### 二、试剂盒组成和配制:

| 试剂名称 | 规格           | 保存要求 | 备注                               |
|------|--------------|------|----------------------------------|
| 提取液  | 液体 60mL×1 瓶  | 4℃保存 |                                  |
| 试剂一  | 液体 6mL×1 瓶   | 4℃保存 |                                  |
| 试剂二  | 粉体 mg×1 支    | 4℃保存 | 临用前甩几下使粉剂落入底部，再加入 1.1mL 蒸馏水溶解备用。 |
| 试剂三  | 液体 1mL×1 支   | 4℃保存 |                                  |
| 试剂四  | 液体 0.5mL×1 支 | 4℃保存 |                                  |
| 标准品  | 粉剂 mg×1 支    | 4℃保存 | 若重新做标曲，则用到该试剂。                   |

#### 三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、低温离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水

#### 四、苹果酸合酶（MS）活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

##### 1、样本制备:

① 组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃离心 15min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例提取

② 细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，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）；12000rpm 4℃离心 15min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10<sup>4</sup>）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

③ 液体样本：直接检测；若浑浊，离心后取上清检测。

##### 2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 412nm。

② 所有试剂解冻至室温（25℃），或于水浴锅（25℃）中孵育 15-30min；

③ 试剂一和二和三可按照 100:20:20 比例配成混合液（一枪加 140μL 该混合液）（该混合液用多少配多少，现配现用）。

④ 在 96 孔板中依次加入：

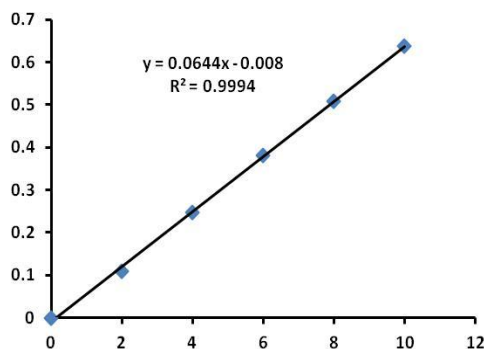
| 试剂名称（μL） | 测定管 |
|----------|-----|
| 样本       | 50  |
| 试剂一      | 100 |
| 试剂二      | 20  |

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| 试剂三                                                           | 20 |
| 混匀，30℃条件下孵育 10min，立即于 412nm 处读取吸光值 A1，                        |    |
| 试剂四                                                           | 10 |
| 混匀，30℃条件下反应 30min，立即于 412nm 处读取吸光值 A2， $\Delta A = A2 - A1$ 。 |    |

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；  
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

## 五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y = 0.0644x - 0.008$ ，x 是标准品质量： $\mu\text{g}$ ，y 是  $\Delta A$ 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持

2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟催化产生 1nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$MS(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.008) \div 0.0644] \div (V1 \times Cpr) \div T \div Mr \times 10^3 = 13.5 \times (\Delta A + 0.008) \div Cpr$$

3、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟催化产生 1nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$MS(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.008) \div 0.0644] \div (W \times V1 \div V) \div T \div Mr \times 10^3 = 13.5 \times (\Delta A + 0.008) \div W$$

4、按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生 1 nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$MS(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.008) \div 0.0644] \div (500 \times V1 \div V) \div T \div Mr \times 10^3 = 0.027 \times (\Delta A + 0.008)$$

5、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升液体每分钟催化产生 1 nmol 辅酶 A 定义为一个酶活力单位。

$$MS(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.008) \div 0.0644] \div V1 \div T \div Mr \times 10^3 = 13.5 \times (\Delta A + 0.008)$$

V1---加入样本体积，0.05mL； V---加入提取液体积，1mL； T---反应时间，30min；

W---样本质量，g； CoA---Mr 分子量，767.5； 500---细胞或细菌总数，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL； 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。