

## 苹果酸合酶（malate synthase, MS）试剂盒说明书

（微板法 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： $\text{acetyl-CoA} + \text{glyoxylate} + \text{H}_2\text{O} = (\text{S})\text{-malate} + \text{CoA}$

### 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：

#### 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。

#### 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℃），在 96 孔板中依次加入：

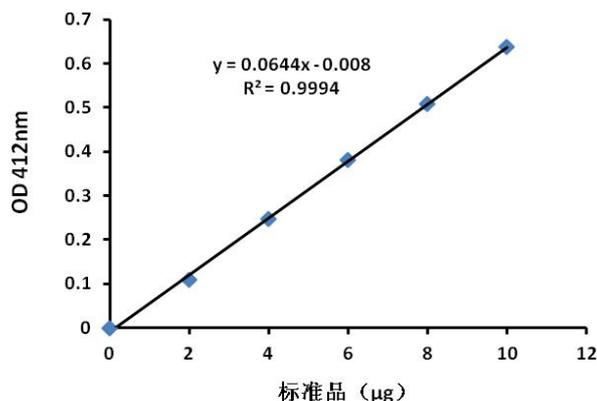
试剂名称（ $\mu\text{L}$ ）	测定管
样本	50
试剂一	100
试剂二	20
试剂三	20
混匀，30℃ 条件下孵育 10min，立即于 412nm 处读取吸光值 A1，	
试剂四	10

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】**：若 $\Delta A$  过小，可以延长反应时间 T（如：30℃条件下孵育 60min 或更长），或增加样本量 V1（如增至 100 $\mu$ L，则试剂一相应减少）。调整后的 T 或 V1 需代入公式重新计算。

## 五、结果计算：

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



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。

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

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。

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

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。

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

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，500 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。

附：标准曲线制作过程：

- 1 制备标准品母液（1mg/mL）：用 1mL 蒸馏水溶解标准品（母液需在两天内用且-20℃保存）。
- 2 把母液稀释成六个浓度梯度的标准品：0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2 mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据以下步骤操作，50 $\mu$ L 标准品+130 $\mu$ L 试剂一+20 $\mu$ L 试剂三，根据结果即可制作标准曲线。