CheKine™ 甲基柠檬酸合酶（MCS）活性检测试剂盒（微量法）

货号: KTB1027　　规格: 48 T/48 S　96 T/96 S　　批号：见产品标签

	适用样本：动植物组织、细胞
	保质期：-20℃，避光保存 6 个月

01 背景与原理

甲基柠檬酸合酶（methylcitrate synthase，MCS）（EC 2.3.3.2）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。

本试剂盒检测原理是 MCS 催化丙酰 CoA 和草酰乙酸产生甲基柠檬酰辅 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 412 nm 处有特征吸光值。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Reagent Ⅰ	60 mL	60×2 mL	4℃
Reagent Ⅱ	12 mL	24 mL	4℃
Reagent Ⅲ	1.2 mL	2.4 mL	4℃
Reagent Ⅳ	15 mL	30 mL	4℃
Reagent Ⅴ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	4℃
Reagent Ⅵ	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃，避光保存

***请在实验前检查各组分的量。**

***各组分在规格基础上额外提供 10%的量用于进行标准曲线制作或预实验。**

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 412 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	普通透明板
试剂	去离子水、无水乙醇	试剂配制、检测体系配制用
其他	匀浆器（组织样本）、低温离心机、水浴锅、1.5 mL 离心管、可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有助于提高实验效率

04 注意事项

- **正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。**
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，**请在实验全程做好生物安全防护**，穿戴实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Reagent Ⅰ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent Ⅱ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent Ⅲ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存；**Reagent Ⅲ有毒且有刺激性气味，建议在通风橱进行实验**
Reagent Ⅳ	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Working Reagent Ⅴ	临用前配制；48 T 加入 0.6 mL 无水乙醇和 13.2 mL Reagent Ⅳ，96 T 加入 1.2 mL 无水乙醇和 26.4 mL Reagent Ⅳ，充分溶解待用。	未用完的试剂分装后-20℃避光保存 1 个月，禁止反复冻融
Working Reagent Ⅵ	临用前配制；48 T 加入 1.5 mL 去离子水，96 T 加入 3 mL 去离子水，充分溶解待用	未用完的试剂分装后-20℃避光保存 1 个月，禁止反复冻融

05-2 样本制备

注意：建议使用新鲜样本。如果不立即使用，可将样品在-80℃下保存一个月。测定时，应控制解冻的温度和时间。室温环境下解冻时，需在 4 h 内完成样品解冻。尽量用新鲜样本提取 MCS，以保证酶的活力。

- **组织或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：**称取约 0.1 g 样本或收集 5x10^6 个细胞，加入 1 mL Reagent Ⅰ和 10 μL Reagent Ⅲ，用匀浆器或研钵冰浴匀浆。将匀浆 600 g，4℃离心 5 min，弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000 g，4℃离心 10 min，上清液即为除去线粒体的胞浆蛋白，可用于测定从线粒体泄漏的 MCS（可选做）。沉淀即为线粒体，加入 200 μL Reagent Ⅱ和 2 μL Reagent Ⅲ，超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 10 s，重复 30 次），用于线粒体 MCS 测定。

05-3 实验步骤

注意：测定过程中样本和所有试剂在冰上放置，以免变性和失活。

1. **酶标仪准备**：预热 30 min 以上，调节波长到 412 nm。
2. 将 Working Reagent **V** 在 37℃(哺乳动物)或 25℃（其它物种）预热 10 min。
3. **检测体系配制**：在 96 孔板中按照如下方式操作

试剂	测定孔（μL）
样本	20
Working Reagent Ⅴ	220
Working Reagent Ⅵ	10

4. **吸光度检测：**立即混匀测定 412 nm 处吸光值。记录初始和 20 min 时吸光值，分别记录为 A_1 和 A_2。上清孔的记为 $A_{上清}$，沉淀孔的记为 $A_{沉淀}$。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧**二维码**或访问官网[**https://www.abbkine.cn**] > 进入“**技术中心**”> 查找“**在线计算器**”**工具**。

06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算$\Delta A=A_2-A_1$，$\Delta A_{上清}=A_{2\,上清}-A_{1\,上清}$，$\Delta A_{沉淀}=A_{2\,沉淀}-A_{1\,沉淀}$

2. 样本 MCS 含量计算

- 按样本质量计算：

单位的定义：每克组织每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活性单位。

$MCS_{上清}(U/g)=[\Delta A_{上清}\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times10^9]\div(W\times V_{样}\div V_{提取})\div T=\mathbf{92.83\times\Delta A_{上清}\div W}$

$MCS_{沉淀}(U/g)=[\Delta A_{沉淀}\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times10^9]\div(W\times V_{样}\div V_{样总})\div T=\mathbf{18.57\times\Delta A_{沉淀}\div W}$

$总\ MCS(U/g)=MCS_{上清}+MCS_{沉淀}=\mathbf{92.83\times\Delta A_{上清}\div W+18.57\times\Delta A_{沉淀}\div W}$

- 按细胞数量计算：

单位的定义：每 10^4 个细胞每分钟催化产生 1 nmol TNB 定义为一个酶活性单位。

$MCS_{上清}(U/10^4)=[\Delta A_{上清}\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times10^9]\div(N\times V_{样}\div V_{提取})\div T=\mathbf{92.83\times\Delta A_{上清}\div N}$

$MCS_{沉淀}(U/10^4)=[\Delta A_{沉淀}\times V_{反总}\div(\varepsilon\times d)\times10^9]\div(N\times V_{样}\div V_{样总})\div T=\mathbf{18.57\times\Delta A_{沉淀}\div N}$

$总\ MCS(U/10^4)=MCS_{上清}+MCS_{沉淀}=\mathbf{92.83\times\Delta A_{上清}\div N+18.57\times\Delta A_{沉淀}\div N}$

$\Delta A_{上清}$：上清测定值；$\Delta A_{沉淀}$：沉淀测定值；$V_{反总}$：反应体系总体积，2.5×10^{-4} L；ε：TNB 摩尔消光系数，1.36×10^4 L/mol/cm；d：96 孔板光径，0.5 cm；$V_{样}$：加入样本体积，0.02 mL；$V_{提取}$：加入 Reagent Ⅰ和Ⅲ的体积，1.01 mL；$V_{样总}$：加入 Reagent Ⅱ和Ⅲ的体积，0.202 mL；T：反应时间，20 min；W：样本质量，g；N：细胞数量，以 10^4 为单位（例如细胞数量为 5×10^6，N=500）。

07 结果展示

示例-1：称取 0.192 g 小鼠心脏，按照测定步骤操作，用 96 孔板进行检测。测得：$\Delta A_{上清}=A2_{上清}-A1_{上清}$=0.356-0.291=0.065，$\Delta A_{沉淀}=A2_{沉淀}-A1_{沉淀}$=1.200-1.009=0.191，按样本质量计算得：总 MCS(U/g)=$92.83\times\Delta A_{上清}\div W+18.57\times\Delta A_{沉淀}\div W$=31.427+18.473=49.9 U/g。

08 FAQ

- **检测得到的样本ΔA 过高或者过低怎么办?**

如果ΔA 小于 0.01 可适当加大样本量。如果 A 大于 1.5 或ΔA 大于 1，样本可用 Reagent Ⅰ或 Reagent Ⅱ进一步稀释，或减少提取用样本量，再重新进行测定。

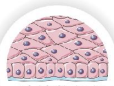
09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB1270	CheKine™ 丙酮酸脱氢酶（PDH）活性检测试剂盒（微量法）
KTB1023	CheKine™ 柠檬酸合酶（CS）活性检测试剂盒（微量法）

CheKine™ 甲基柠檬酸合酶（MCS）活性检测流程示意图

（Abbkine 货号 ： KTB1027）

样本处理





1 mL Reagent I 和10 μL Reagent III,冰浴匀浆



600 g，4℃离心5 min，收集上清至新的离心管中，舍弃沉淀，再次离心上清，11000 g，4℃离心10 min，分别得到上清和沉淀



上清，冰上待测



在沉淀中加入200 μL Reagent II和2 μL Reagent III混匀，冰浴超声破碎5 min（功率20%或200 W，超声3 s，间隔7 s，重复30次）冰上待测

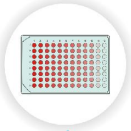
体系配置



样本	20 μL
Working Reagent V	220 μL
Working Reagent VI	10 μL

迅速混匀

数据检测



测定初始和20 min时412 nm吸光度

结果计算

V1.0