



线粒体苹果酸脱氢酶活性检测试剂盒

MDHm Assay Kit

微量法

产品编号: AK410M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK410-A	100mL×1 瓶	-20℃保存;
AK410-B	20mL×1 瓶	-20℃保存;
AK410-C	1.5mL×1 支	-20℃保存;
AK410-D	20 mL×1 瓶	4℃保存;
AK410-E	粉剂×1 瓶	-20℃保存;

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 苹果酸脱氢酶 (MDH) (EC 1.1.1.37) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 线粒体中MDH是TCA循环的关键酶之一, 催化苹果酸形成草酰乙酸; 相反, 胞浆中MDH催化草酰乙酸形成苹果酸。草酰乙酸是重要的中间产物, 连接多条重要的代谢途径。因此, MDH在细胞多种生理活动中扮演着重要的角色, 包括线粒体的能量代谢、苹果酸-天冬氨酸穿梭系统、活性氧代谢和抗病性等。根据不同的辅酶特异性, MDH分为NAD-依赖的MDH和NADP-依赖的MDH, 细菌中通常只含有NAD-MDH, 在真核细胞中, NAD-MDH分布于细胞质和线粒体中。

原理: MDHm 催化 NADH 还原草酰乙酸生成苹果酸, 导致 340nm 处光吸收下降。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板、研钵、冰、无水乙醇和蒸馏水。

样本的前处理:

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离:

1. 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞, 加入 1mL AK410-A 和 10uL AK410-C, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 将匀浆 600g, 4℃离心 5min。
3. 弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4℃离心 10min。
4. 上清液即胞浆提取物, 可用于测定从线粒体泄漏的 CS (此步可选做)。
5. 在步骤 4 中的沉淀中加入 200uL AK410-B 和 2uL AK410-C, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3 秒, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 用于线粒体 CS 测定。

测定步骤:

1. 分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 检测工作液的配制: 用时在 AK410-E 中加入 19mL AK410-D 和 0.5mL 蒸馏水, 充分混匀待用; 剩余试剂分装后 -20℃保存, 禁止反复冻融;
3. 测定前将检测工作液在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 10min 以上。
4. 样本测定 (在微量石英比色皿或 96 孔板中加入):

试剂名称	测定管 (μL)
------	----------

样本	5
工作液	195
混匀后立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 1min20s 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。	

MDHm 含量计算：

a. 使用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

1. 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHm (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 6430 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHm (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1299 \times \Delta A \div W$$

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消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHm (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.65 \times \Delta A$$

注： $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm； d ：比色皿光径，1cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.005 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，0.202mL； T ：反应时间，1 min； W ：样本质量，g； Cpr ：样本蛋白质浓度，mg/mL；2000：细胞或细菌总数，2000 万。

※ 蛋白定量检测建议使用本公司：BCA Protein Assay Kit ([C05-02001](#))

b. 使用 96 孔板测定的计算公式如下：

1. 按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHm (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 12860 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2. 按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHm (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2598 \times \Delta A \div W$$

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消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHm (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.3 \times \Delta A$$

注： $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm； d ：96 孔板光径，0.5cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.005 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，0.202 mL； T ：反应时间，1 min； W ：样本质量，g； Cpr ：样本蛋白质浓度，mg/mL；2000：细胞或细菌总数，2000 万。