

线粒体苹果酸脱氢酶活性检测试剂盒

MDH Assay Kit

紫外分光光度法

产品编号: AK410U

产品规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
AK410-A	50mL×1 瓶	-20℃保存;
AK410-B	10mL×1 瓶	-20℃保存;
AK410-C	1mL×1 支	-20℃保存;
AK410-D	50mL×1 瓶	4℃保存;
AK410-E	粉剂×2 支	-20℃保存; 临用前加入 300μL 蒸馏水, 充分溶解待用; 剩余试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。
AK410-F	粉剂×2 支	-20℃保存; 临用前加入 300μL 蒸馏水, 充分溶解待用; 剩余试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。

※ 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: MDH 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:

紫外分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1 mL 石英比色皿和蒸馏水。

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 MDH (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 MDH 测定。

测定步骤:

1. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
2. 将 AK410-D 在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 10min 以上。
3. 样本测定:

试剂名称	测定管 (μL)
------	----------

样本	20
AK410-D	760
AK410-E	10
AK410-F	10
将上述试剂按顺序加入 1 mL 石英比色皿中，混匀后立即在 340 nm 波长下记录初始吸光度 A1 和反应 1min 后的吸光度 A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。	

MDH 活力单位的计算：

1. 按样本蛋白浓度计算

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

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

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。

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

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。

$$\text{MDH (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1299 \times \Delta A$$

注： V 反总：反应体系总体积， 8×10^{-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 样：加入样本体积，0.02mL；V 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；N：细胞或细菌总数，以万计。

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