

线粒体苹果酸脱氢酶（MDHm）检测试剂盒（微量法）

货号：PMK1114

保存：-20℃避光保存 6 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织、细胞和真菌

产品简介

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。本试剂盒提供了一种简单、方便、快速的 MDHm 活性检测方法，其原理是 NADH 在 340nm 处有特征吸收峰，MDHm 催化 NADH 还原草酰乙酸生成苹果酸，导致 340nm 处光吸收下降。通过检测 340nm 吸光值的下降既可计算 MDHm 活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	50mL	100mL	4℃ 保存
试剂二	10mL	20mL	4℃ 保存
试剂三	1mL	2mL	-20℃ 避光保存
试剂四	10mL	20mL	4℃ 保存
试剂五	1	1	-20℃ 避光保存

自备耗材

酶标仪或紫外分光光度计（能测 340nm 处的吸光度）
96 孔 UV 微孔板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头
水浴锅、制冰机，低温离心机
去离子水
匀浆器

试剂准备

注意：各组分（小管试剂）开盖前，请先低速离心。

试剂一：即用型；4℃ 保存。

试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

试剂三：即用型；使用前，平衡到室温；-20℃ 避光保存。

试剂四：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。

工作液：临用前配制，对于 48 T，试剂五加入 9.5 mL 试剂四和 0.25 mL 去离子水，对于 96 T，试剂五加入 19 mL 试剂四和 0.5 mL 去离子水，充分混匀待用；未用完的试剂分装-20℃ 避光保存，避免反复冻融。

样本制备

组织、细胞和真菌中胞浆蛋白与线粒体蛋白的提取：

- 准确称取 0.1g 组织或收集 500 万个细胞，加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂三，冰浴匀浆；
- 离心匀浆液，600g，5min，4℃，收集上清液至另一新的离心管中，舍弃沉淀；

产品说明书

- 再次离心上清, 11,000 g, 10min, 4℃, 沉淀即为提取的线粒体, 用作第 5 步操作;
- (选做) 上清液即为胞浆提取物, 可作为样本用于测定胞浆中苹果酸脱氢酶 (MDH) 活性;
- 在沉淀中加入 200μL 试剂二和 2μL 试剂三, 充分重悬沉淀, 用于下一步线粒体苹果酸脱氢酶 (MDHm) 活性检测。

注意: 推荐使用新鲜样本, 如果不立即进行实验, 样本可在-80℃保存 1 个月。测定过程中样本冰上放置, 以免变性和失活。如需测定蛋白浓度, 推荐使用 BCA 蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

- 酶标仪或紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长到 340nm。紫外分光光度计去离子水调零。
- 工作液于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 孵育 10min。
- 在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中加入 5 μL 样本和 195 μL 工作液, 迅速混匀后于 340nm 检测, 记录 20s 和 1min 20s 的吸光值, 分别记为 A_1 和 A_2 , 计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

注意: 1. 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 ΔA 小于 0.001 可适当加大样本量; 如果 ΔA 大于 0.5, 可用试剂二稀释样品, 计算时结果乘以稀释倍数。

- 测定反应的温度对测定结果有影响, 请控制在 25℃ (一般物种) 或者 37℃ (哺乳动物)。
- 因通过反应速率计算酶活, 使用 96 孔 UV 板时请根据操作速度控制一次测定的样本数 (通常一次测定 4-8 个样本)。

结果计算

A. 使用 96 孔板测定的计算公式

1. 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

2. 按细胞或真菌细胞数量计算:

单位的定义: 每 1 万个细胞或真菌在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHm 活性 (U/10}^4 \text{ cells)} = [\Delta A_{\text{沉淀}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 5.2 \times \Delta A_{\text{沉淀}}$$

3. 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHm 活性 (U/mg prot)} = [\Delta A_{\text{沉淀}} \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 12861 \times \Delta A_{\text{沉淀}} \div \text{Cpr}$$

$V_{\text{反应}}$: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 mol/L/cm; d : 0.5 cm; 10^9 : 1mol = 1×10^9 nmol; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.005 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入试剂二和试剂三的体积, 0.202mL; T : 反应时间, 1min; W : 样品质量, g; 500: 细胞或真菌总数, 500 万; Cpr : 样本蛋白质浓度, mg/mL。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径 d : 0.5cm 调整为 d : 1cm 进行计算即可。

注意事项

- 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验, 尤其是在检测血样或其他体液时。
- 本试剂盒仅用于实验室科学研究, 如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途, 我们将不对任何后果负责。
- 本试剂盒应在有效期内使用, 并请严格按照说明书进行存储。
- 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用; 否则, 可能导致结果异常。
- 勤换吸头, 避免各组分之间的交叉污染。

相关产品:

PMK1115 乳酸 (LA) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1116 丙酮酸 (PA) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1110 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解, 请关注公众号:

