



线粒体苹果酸脱氢酶 (MDHm) 活性检测试剂盒

Mitochondrial Malate Dehydrogenase (MDHm) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



线粒体苹果酸脱氢酶 (MDHm) 活性检测试剂盒

Mitochondrial Malate Dehydrogenase (MDHm) Activity Assay Kit

一、产品描述

苹果酸脱氢酶 (MDH) 广泛存在于动植物、微生物和培养细胞中, 能够催化苹果酸与草酰乙酸间的可逆转换, 在细胞线粒体能量代谢、苹果酸-天冬氨酸穿梭系统、活性氧代谢等多种生理活动中扮演着重要的角色。

线粒体苹果酸脱氢酶能够催化 NADH 还原草酰乙酸生成苹果酸, NADH 在 340 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化即可表征线粒体苹果酸脱氢酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	液体 120 mL×1 瓶	-20°C保存	-
试剂二	液体 25 mL×1 瓶	-20°C保存	-
试剂三	液体 1.5 mL×1 支	-20°C避光保存	-
试剂四	液体 25 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂五	粉剂×1 支	-20°C避光保存	使用前加入 650 μ L 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月, 避免反复冻融)
试剂六	粉剂×1 支	-20°C避光保存	使用前加入 650 μ L 蒸馏水充分溶解 (分装后-20°C可保存 1 个月, 避免反复冻融)

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿 (光径 10 mm) /96 孔 UV 板、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 粗酶液的制备 (可根据预实验结果适当调整样本量及比例)

①称取 100 mg 组织或收集 500 万细胞, 加入 1 mL 试剂一和 10 μ L 试剂三, 使用匀浆器或研钵冰浴研磨至匀浆, 匀浆液 4°C 600 g 离心 10 min, 弃沉淀, 留上清;

②吸取步骤①离心后全部上清液至另一离心管中, 4°C 12000 g 离心 10 min, 弃上清, 留沉淀;

③步骤②离心后沉淀中加入 200 μ L 试剂二和 2 μ L 试剂三, 冰浴超声破碎 (功率 20%或 200 W, 超声 5 s, 间隔 10 s, 重复 15 次) 即为粗酶液, 用于线粒体苹果酸脱氢酶活性测定。

2.测定步骤

- ①紫外分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。
- ②试验前将**试剂四** 37℃预热 20 min 以上。
- ③在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	空白组 (μL)
粗酶液	5	-
蒸馏水	-	5
试剂四	185	185
试剂五	5	5
试剂六	5	5

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s 时（总时间）340 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②37℃恒温准确反应 60 s，测定 70 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；③计算 ΔA 测定=A1 测定-A2 测定， ΔA 空白=A1 空白-A2 空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 空白。

注：空白组只需测定 1-2 次。

3.线粒体苹果酸脱氢酶（MDHm）活性计算

3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

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

$$\text{MDHm (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{12861.74 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织样本每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHm (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{2589.07 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHm (U/10}^4\text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{2589.07 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

3.2 使用微量石英比色皿测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

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

$$\text{MDHm (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times \text{Cpr} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{6430.87 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织样本每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHm (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1299.04 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{MDHm (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{1299.04 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.005 mL；V 样总：粗酶液总体积，0.202 mL；V 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_1 ：96 孔 UV 板光径，0.5 cm； d_2 ：微量石英比色皿光径，1 cm；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：反应时间：1 min； 10^9 ：单位换算系数，1 mol = 10^9 nmol。

四、注意事项

- ①粗酶液制备过程必须在冰上进行，保持低温环境以防止酶变性失活；
- ②试验过程中试剂五、试剂六和粗酶液需置于冰上放置，以防止变性和失活；
- ③若 A1 测定大于 1.5 或 ΔA 大于 0.3，建议将粗酶液适当稀释后再进行测定；若 ΔA 小于 0.02，建议适当延长酶促反应时间（37°C 反应时间）或增加样本量后再进行测定，计算时相应修改；
- ④准确在 10 s 和 70 s 处完成吸光值测定，以确保实验结果的准确性和重复性；若使用 96 孔 UV 板进行测定，应使用多道移液器且分批进行检测，以确保组间反应时间一致；
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

