

线粒体苹果酸脱氢酶（MDHm）试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

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。

测定原理：

MDHm催化NADH还原草酰乙酸生成苹果酸，导致340nm处光吸收下降。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/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孔板和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一：100mL×1瓶，-20℃保存；

试剂二：20mL×1瓶，-20℃保存；

试剂三：1.5mL×1支，-20℃保存；

试剂四、液体20 mL×1瓶，在4℃保存；

试剂五、粉剂×1瓶，-20℃保存；

样本测定的准备：

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试剂一和10uL试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
2. 将匀浆液于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的沉淀中加入200uL试剂二和2uL试剂三，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MDHm活性测定。

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：用时在试剂五中加入19mL试剂四和0.5mL蒸馏水，充分混匀待用；用不完的试剂分装后-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. 在微量石英比色皿或96孔板中加入5μL样本和195μL工作液，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ΔA=A1-A2。

MDHm活力单位的计算:

a.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。

$$\text{MDHm (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 6430 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{MDHm (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1299 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{MDHm (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.65 \times \Delta A$$

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: 比色皿光径, 1cm; V样: 加入样本体积, 0.005 mL; V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。

b.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。

$$\text{MDHm (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 12860 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{MDHm (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 2598 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{MDHm (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.3 \times \Delta A$$

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: 96孔板光径, 0.5cm; V样: 加入样本体积, 0.005 mL; 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; 2000: 细胞或细菌总数, 2000万。