

线粒体苹果酸脱氢酶（MDHm）检测试剂盒（微量法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

- 试剂一：液体 100mL×1 瓶，-20℃ 保存；
- 试剂二：液体 20mL×1 瓶，-20℃ 保存；
- 试剂三：液体 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 $\Delta A = A1 - A2$ 。

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。

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

(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。

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

(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。

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

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。

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

(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。

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

(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。

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

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, 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。