

## 线粒体苹果酸脱氢酶（MDHm）试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

**注 意：**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、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。

### 试剂的组成和配制：

试剂一：液体 50mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂二：液体 10mL×1 瓶，-20℃保存；

试剂三：液体 1mL×1 支，-20℃保存；

试剂四、液体 50 mL×1 瓶，在 4℃保存；

试剂五、粉剂×2 支，-20℃保存；临用前加入 300μL 蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

试剂六、粉剂×2 支，-20℃保存；临用前加入 300μL 蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

### 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中的沉淀中加入 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、将试剂四在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 10min 以上。
- 3、操作表：

| 试剂名称（μL） | 测定孔 |
|----------|-----|
| 样本       | 20  |
| 试剂四      | 760 |
| 试剂五      | 10  |
| 试剂六      | 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  $\Delta A = A1 - A2$ 。

计算公式中乘以相应稀释倍数。

#### MDHm 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。

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

- （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。

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

- （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。

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

V 反总：反应体系总体积， $8 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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；2000：细胞或细菌总数，2000 万。