

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。

组成:

产品名称	KC015-100T/96S	Storage
试剂一: 液体	100ml	-20°C
试剂二: 液体	20ml	-20°C
试剂三: 液体	1.5ml	-20°C
试剂四: 液体	20 ml	4°C
试剂五: 粉剂	1 瓶	-20°C
说明书	一份	

自备仪器和用品:

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。

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 10 μ l 试剂三, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、将匀浆液于 600g, 4°C 离心 5min。
- 3、弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4°C 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 200 μ l 试剂二和 2 μ l 试剂三, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20%或 200W, 超声 3 秒, 间

最终解释权所有 © 伊势久 (江苏连云港) 生物科技有限责任公司, 保留一切权利



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。

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

(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， 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。

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

(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。

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

(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。

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

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。

