

组织及血液苹果酸脱氢酶（MDH）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHC3-C48	组织及血液苹果酸脱氢酶（MDH）试剂盒	48T	常量法

产品说明:

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。

NAD-MDH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:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂二	粉剂×2 支	-20℃ 保存
试剂三	粉剂×2 支	-20℃ 保存

溶液的配制:

- 1、试剂二：临用前加入360 μL 双蒸水，用不完的试剂仍-20℃保存；
- 2、试剂三：临用前加入327 μL 双蒸水，用不完的试剂仍-20℃保存。

操作步骤:

一、样本处理

细菌或培养细胞：收集细菌或细胞到离心管内，离心弃上清，按照每200 万细菌或细胞加入400μL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率200w，超声3s，间隔10s，重复30 次），8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

组织：称取约0.05g 组织，加入1mL 提取液进行冰浴匀浆；8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。血清（浆）样本：直接检测。（若溶液有浑浊，则离心后测定）

二、测定步骤

- 1、紫外分光光度计提前预热30min，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
- 2、试剂一37℃预热15min。
- 3、样本测定:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
样本	20	-
蒸馏水	-	20

试剂一	760	760
试剂二	10	10
试剂三	10	10

将上述试剂按顺序加入 1mL 石英比色皿中，立即按下计时器，充分吸打混匀（10s）立即在 340nm 波长下记录第 10s 吸光度A1 和反应 1min10s 后的吸光度A2，尽量保持反应温度为37℃。计算 $\Delta A=A_1-A_2$ 。记录 ΔA 测定、 ΔA 空白。（空白管只需测 1-2 次）

三、NAD-MDH活力单位的计算

1. 血清（浆）NAD-MDH活力的计算

单位的定义：每毫升血清（浆）在反应体系中每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (U/mL)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应总}} \div V_{\text{样本}} \div T = 6431 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

2. 组织中NAD-MDH活力的计算

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白在反应体系中每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应总}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 6431 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算：

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (U/g 质量)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应总}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 6431 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

3. 细菌或培养细胞中NAD-MDH活力的计算

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白在反应体系中每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应总}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 6431 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每1万个细菌或细胞在反应体系中每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (U/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应总}} \div (500 \times V_{\text{样本}}) \div T = 13 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

V反应总：反应总体积，0.8mL；V样本：加入样本体积，0.02mL；V提取：提取液体积，1mL； ϵ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ mL/nmol/cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；T：反应时间，1min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；500：细菌或细胞密度，500万/mL；W：样本质量，g。

注意事项：

- 1、粗酶液的提取必须在0℃-4℃中操做完成，以防止酶变性失活。
- 2、实验时，试剂二、试剂三和样本在冰上放置，以免变性和失活。
- 3、当初始读值小于0.7 或者 ΔA 大于0.5 时建议稀释后测量。
- 4、建议一人加样一人比色。