

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-M96 | 组织及血液苹果酸脱氢酶（MDH）试剂盒 | 96T | 微量法 |

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 100 mL×1 瓶 | 4℃ 保存 |
| 试剂一 | 液体 20 mL×1 瓶 | 4℃ 保存 |
| 试剂二 | 粉剂×1 支 | -20℃ 保存 |
| 试剂三 | 粉剂×1 支 | -20℃ 保存 |

溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 360 μ L 双蒸水，用不完的试剂仍-20℃ 保存；
- 2、试剂三：临用前加入 327 μ L 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 400 μ L 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，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。

二、测定步骤

- 1、紫外分光光度计/酶标仪提前预热 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 (μ L) | 测定管 | 空白管 |
|-----------------|-----|-----|
|-----------------|-----|-----|

| | | |
|-----|-----|-----|
| 样本 | 5 | - |
| 蒸馏水 | - | 5 |
| 试剂一 | 190 | 190 |
| 试剂二 | 2.5 | 2.5 |
| 试剂三 | 2.5 | 2.5 |

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿/96孔UV板中，充分吸打混匀后立即在340nm波长下记录初始吸光度A1和反应1min后的吸光度A2，尽量保持反应温度为37℃。计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。记录 ΔA 测定、 ΔA 空白。（空白管测1-2管即可）

三、NAD-MDH活力单位的计算

A：使用微量石英比色皿检测的计算公式如下

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。

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

反总 $\div V_{样本} \div T = 6431 \times (\Delta A_{测定} - \Delta A_{空白})$

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。

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

$\times C_{pr} \div T = 6431 \times (\Delta A_{测定} - \Delta A_{空白}) \div C_{pr}$ (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。

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

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。

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

$\times C_{pr} \div T = 6431 \times (\Delta A_{测定} - \Delta A_{空白}) \div C_{pr}$ (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。

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

反总 $\div (500 \times V_{样本}) \div T = 13 \times (\Delta A_{测定} - \Delta A_{空白})$

V反总：反应总体积，0.2mL；V样本：加入样本体积，0.005mL；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。

B：使用96孔UV板检测的计算公式如下

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。
$$\text{NAD-MDH (U/mL)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样本}} \div T = 10718 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

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。

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 10718 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

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

$$= 10718 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

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。

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 10718 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

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。
$$\text{NAD-MDH (U/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样本}}) \div T = 21 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

V反总：反应总体积，0.2mL；V样本：加入样本体积，0.005mL；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：96孔UV板光径，0.6cm；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、使用光径为1cm的微量石英比色皿时当初始读值小于0.7或者 ΔA 大于0.5时建议稀释后测量。使用96孔UV板时当初始读值小于0.4或者 ΔA 大于0.3时建议稀释后测量。
- 4、建议一人加样一人比色。因时间监测范围小，不推荐用96孔UV板同时测多个样本。