

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-M48	苹果酸脱氢酶（MDH）活性检测试剂盒	48T	微量法
AMHC3-M96		96T	

一、测定意义：

MDH 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。

二、测定原理：

MDH 催化 NADPH 还原草酰乙酸生成苹果酸，导致 340nm 处光吸收下降。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 60mL×1 瓶	液体 110mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂一	液体 0.6mL×1 瓶	液体 1.2mL×1 瓶	2~8℃保存
试剂二	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	2~8℃保存
试剂二的配制： 使用前每瓶粉剂中加入 0.6mL 蒸馏水充分震荡溶解。			
试剂三	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	2~8℃保存
试剂三的配制： 使用前每瓶粉剂中加入 0.6mL 蒸馏水充分震荡溶解。			
试剂四	液体 12mL×1 瓶	液体 24mL×1 瓶	2~8℃保存

四、操作步骤：

样本前处理

1、组织：按照组织质量（g）:提取液体积(mL)为 1:5~10 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm, 4℃ 离心 10 min，取上清置冰上待测。

2、细菌、细胞：按照细胞数量 10^4 个：提取液体积 (mL) 500~1000:1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3s，间隔 7s，总时间 3 min），5000 rpm, 4℃ 离心 10min，取上清置冰上待测。

3、血清（浆）等液体样本：直接测定。若有浑浊请离心后取上清待测。

测定步骤

1、酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零；

2、样本测定（在 96 孔 UV 板中依次加入下列试剂）：

试剂名称	测定管	空白管
试剂一 (μL)	10	10
试剂二 (μL)	10	10
试剂三 (μL)	10	10
试剂四 (μL)	200	200
样品 (μL)	10	-
蒸馏水 (μL)	-	10

充分吹打混匀后立即记录 340nm 波长下初始吸光度 A1 和反应 1min 后的吸光度 A2，计算 $\Delta A_{\text{空白}}=A1_{\text{空白}}-A2_{\text{空白}}$ ，
 $\Delta A_{\text{测定}}=A1_{\text{测定}}-A2_{\text{测定}}$ ，计算 $\Delta A=\Delta A_{\text{测定}}-\Delta A_{\text{空白}}$ 。（空白管测 1-2 管即可）

五、苹果酸脱氢酶（MDH）活性测定：

1、按样本蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

计算公式：MDH (U/mg prot) = $\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}} \times T)$
 $= 643.09 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

2、按样本质量计算

单位定义: 每 g 组织样品每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{计算公式: } \text{MDH (U/g)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times W \times T)$$

$$= 643.09 \times \Delta A \div W$$

3、按细胞数量计算

单位定义: 每 10^4 细胞每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{计算公式: } \text{MDH (U/}10^4\text{cell}\text{)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times 500 \times T)$$

$$= 1.29 \times \Delta A$$

4、按液体体积计算

单位定义: 每 mL 液体每分钟消耗 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{计算公式: } \text{MDH (U/g)} = \Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9 \div (\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times T)$$

$$= 643.09 \times \Delta A$$

$V_{\text{样总}}$: 待测样本总体积, 1 mL; $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2.4×10^{-4} L;

$V_{\text{样}}$: 反应体系中加入粗酶液的体积, 0.01 mL; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d : 96 孔 UV 板光径, 0.6cm; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; W : 样本质量, g; T : 反应时间: 600 s = 10 min; 500: 细菌或细胞数量, 500 万; 10^9 : 单位换算系数, $1 \text{ mol} = 10^9 \text{ nmol}$ 。

六、注意事项:

- 1、样本的提取必须在 0°C - 4°C 中操作完成, 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、为保证结果准确且避免试剂损失, 测定前请仔细阅读说明书 (以实际收到说明书内容为准), 确认试剂储存和准备是否充分, 操作步骤是否清楚, 且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定。

4、如果测定吸光值超过线性范围吸光值, 可以增加样本量或者稀释样本后再进行测定。计算时注意同步修改计算公式。

【厂家信息】

生产企业: 南京陌凡生物科技有限公司

地址: 南京市栖霞区红枫科技园 A6 栋 2 层

【售后微信】



【说明书核准及修改日期】

核准日期: 2025 年 4 月 7 日

修改日期: 2025 年 4 月 7 日