

苹果酸脱氢酶（MDH）测定试剂盒说明书(精简版)

（货号：A021-1-1 测血清、血浆 紫外法 50T/48 样）

免责声明：测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、试剂盒组成与配制：（试剂盒有效期 6 个月）

|                                                                | 试剂组成 | 试剂装量     | 保存温度    |
|----------------------------------------------------------------|------|----------|---------|
| 试剂一                                                            | 液体   | 12mL×5瓶  | -20℃ 保存 |
| 试剂二                                                            | 粉剂   | 粉剂×3支    | -20℃ 保存 |
|                                                                | 稀释液  | 0.5mL×3支 | -20℃ 保存 |
| 试剂二应用液的配制：临用前将 1 支 2 号稀释液融化后加入到 1 支 2 号粉剂中，充分混匀后即为试剂二应用液，现用现配。 |      |          |         |
| 试剂三                                                            | 粉剂   | 粉剂×2支    | -20℃ 保存 |
|                                                                | 稀释液  | 1mL×2支   | -20℃ 保存 |
| 试剂三应用液的配制：临用前将 1 支 3 号稀释液融化后加入到 1 支 3 号粉剂中，充分混匀即为试剂三应用液，备用。    |      |          |         |
| 工作液的配制：按试剂一：试剂二应用液：试剂三应用液=50：1：1 的比例进行配制,用多少配制多少,现用现配          |      |          |         |

二、所需仪器耗材及试剂：

含 340nm 波长的紫外分光光度计及 0.5cm 光径石英比色皿、37℃ 水浴锅、台式低速离心机、各种规格移液器、双蒸水、生理盐水（0.9%）或 PBS（0.1M）、涡旋混匀器、试管或离心管。

三、操作步骤：

- a、将紫外分光光度计于 340nm 处,0.5cm 光径石英比色皿,以双蒸水调零 (石英比色皿准备两只,一只用于调零,一只用于测定)。
- b、将工作液，37℃ 预温 3 分钟以上。
- c、往相应编号的试管中加入 100μL 待测样本，取 1mL 工作液迅速冲入试管中，立即混匀并计时。(空白管取 100μL 双蒸水,加入 1mL 工作液,其它操作与测定相同)
- d、迅速倒入石英比色皿中在紫外分光光度计 340nm 处比色，20 秒时读取吸光度值（A<sub>1</sub>值）,在 1 分 20 秒时再次测定吸光度值（A<sub>2</sub>值）；
- e、求出 2 次吸光度差值（ΔA=A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>）。

[注]：空白管只须做 1~2 只 (空白 OD 很稳定)

若ΔA 测定<0.05 则需加大样本的浓度；否则影响检测结果。  
若ΔA 测定>0.3，则需将样本的浓度稀释后再测；否则影响检测结果。  
请在批量检测前一定要取正常对照组样本做此样本最佳浓度的预试。

四、计算公式：

1、定义：每毫升血清(浆)在本反应系统中 1 分钟内催化 1μmol 的底物转变成产物定义为 1 个酶活力单位；

2、计算公式：

$$\text{MDH 活力 (U/mL)} = \frac{\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}}{6.2 \times d} \times \frac{V_{\text{反应}}}{V_{\text{样}}} \times N$$

d:比色光径，0.5cm；  
V<sub>反应</sub>：反应体系总体积，1.1mL；  
V<sub>样</sub>：取样量，0.1mL；  
N：样本测试前稀释倍数；  
6.2：底物的微摩尔消光系数。

五、测定原理：

苹果酸脱氢酶（Malate Dehydrogenase, MDH）催化的氧化还原反应伴随着 340nm 处吸光度的降低，通过测定每分钟吸光度的变化来计算苹果酸脱氢酶的活力。

六、测定意义：

MDH 与植物代谢的多条重要途径有密切关系，它在运转物质和能量的 Mal/OAA（苹果酸/草酰乙酸）和 Mal/Asp（苹果酸/天冬氨酸）穿梭中起重要作用；在光呼吸中，MDH

为 Gly（甘氨酸）氧化提供 NAD<sup>+</sup>；在线粒体中，MDH 还是决定 TCA(三羧酸循环)运转速度的调节酶之一；在细胞质中，MDH 与丙酮酸支路相联系。所以 MDH 系统不仅是研究酶区域化和酶调节的好系统，也为研究各细胞器之间的联系和许多发育问题提供了方便。

根据近几年文献报道，该酶不仅与植物病理有关，还与抗冻，抗盐有关。MDH 与抗热的关系仅见于对嗜热菌的报道。

苹果酸脱氢酶可用于继发性肝癌早期诊断与鉴别和心肌病早期诊断

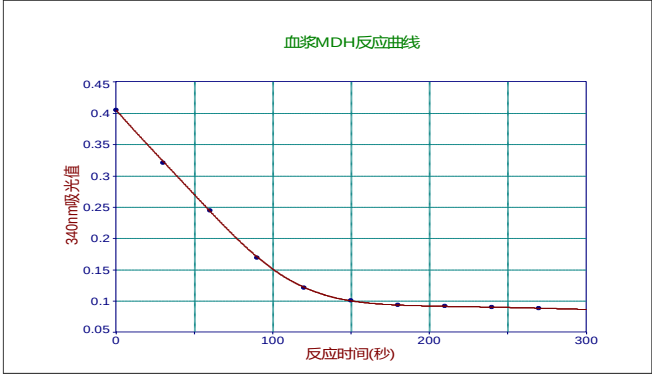
继发性肝癌时 MDH<sub>1</sub>、MDH<sub>2</sub>、MDH<sub>3</sub> 活性均增强。

AMI 时 12~24 小时，MDH<sub>3</sub> 酶带活性增强。也表明心肌细胞线粒体损伤：

- ①、MDH 总活性升高和 MDH<sub>3</sub> 增强：病毒性肝炎初期和病情极变期。幅度与病情的严重性相关，发病初期测定 MDH<sub>3</sub> 意义更大。
- ②、MDH<sub>1</sub> 和 MDH<sub>2</sub> 增强：急性肝炎、肝细胞坏死。
- ③、MDH<sub>1</sub>、MDH<sub>2</sub>、MDH<sub>3</sub> 活性均增强：肝脏肿瘤。有的肿瘤病人出现 MDH<sub>4</sub> 酶带。
- ④、MDH<sub>3</sub> 增强：急性心肌梗塞的阳性率为 91%，峰值出现时间约在 12~24 小时，是反应心肌梗塞严重性的有效指标。

附录 I :小鼠血清酶反应曲线

- 1、样本来源：取小鼠新鲜全血，肝素抗凝，然后置于低速离心机中，以 1000 转/分,离心 10 分钟，然后分离血浆，待测。
- 2、操作表：
  - a、将紫外分光光度计于 340nm 处,0.5cm 光径石英比色皿,以双蒸水调零 (石英比色皿准备两只,一只用于调零,一只用于测定)。
  - b、将工作液，37℃ 预温 3 分钟以上。
  - c、往相应编号的试管中加入 100μL 待测样本，取 1mL 工作液迅速冲入试管中，立即混匀并计时。(空白管取 100μL 双蒸水,加入 1mL 工作液,其它操作与测定相同)
  - d、迅速倒入石英比色皿中在紫外分光光度计 340nm 处比色，20 秒时读取吸光度值（A<sub>1</sub>值）,在 1 分 20 秒时再次测定吸光度值（A<sub>2</sub>值）；
  - e、求出 2 次吸光度差值（ΔA=A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>）。
- 3、绘图如下：



- 4、根据血清（浆）MDH 反应曲线我们可以得出：在 3 分钟内，OD 的变化跟时间成线性关。