

## 苹果酸脱氢酶 (MDH) 活性的测定

### 实验目的:

以草酰乙酸和 NADH 为底物测定苹果酸脱氢酶 (MDH) 的活性

### 检测原理:



### 检测试剂:

1. 磷酸钾缓冲液 (pH7.5) : 0.1M。
2. 草酰乙酸溶液: 15mM (20.0mg 草酰乙酸/10ml 0.1M、pH7.5 磷酸缓冲液)。须现用现配, 冰上配制并存放。
3. NADH 溶液: 6mM (42.5mg NADH/10ml 蒸馏水)。须现配现用, 冰上配制并保存。
4. MDH 酶稀释液: 20.0mg BSA/10ml 0.1M、pH 7.5 磷酸缓冲液。

### 检测步骤:

在冰水浴或冰上完成以下各步骤:

1. 样品准备
  - (1) 干粉样品, 使用纯水溶解样品至 10mg/ml; 液体样品可以直接稀释;
  - (2) 使用溶液 4 稀释样品至 50~500U/ml, 稀释倍数为 B, 需现稀释现用。
2. 按照下表体系混合各储液, 配制反应液。

磷酸钾缓冲液	560 $\mu$ l	总体积
草酰乙酸	20 $\mu$ l	600 $\mu$ l
NADH	20 $\mu$ l	

3. 加样品 10  $\mu$ l, 立即混合并加到分光光度计的比色皿中或吸入生化分析仪中。



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248  
网址: www.shyuanye.com  
邮箱: shyysw@sina.com

4. 在 37 °C 条件下, 用分光光度计或生化分析仪记录 340nm 的吸光度变化率 ( $\Delta OD$  样品/min) (记录 2-5 分钟), 同时测定空白对照的吸光度下降率 ( $\Delta OD$  空白/min)。

**数据处理:**

$$\text{样品酶活(U/L)} = \frac{V_t \times \Delta OD / \text{min}}{V_s \times \epsilon \times \alpha} = \frac{0.610 \times \Delta OD / \text{min}}{0.01 \times 6.22 \times 1.0} \times 1000 = 9807 \times \Delta OD / \text{min}$$

$$\text{MDH制剂干粉活性 (U/mg)} = \frac{\text{样品酶活}}{A} \times \frac{B}{1000}$$

V<sub>t</sub>: 反应总体积 (0.610 ml) ;

V<sub>s</sub>: 样品体积 (0.010ml) ;

$\epsilon$  : 消光系数, NADH 在 340nm 的摩尔消光系数为 6.22 (cm<sup>2</sup> /  $\mu$ mol) ;

$\alpha$  : 光径 (1.000cm) ;

$\Delta OD/\text{min}$ :  $\Delta OD$  样品/min-  $\Delta OD$  空白/min。

A: 样品溶解时的浓度 (10mg/ml) ;

B: 样品的稀释倍数。

