

苹果酸脱氢酶（MDH）测定试剂盒说明书(精简版)

(货号：A021-2-1 测组织 紫外法 50 管/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	保存条件
试剂一	液体	12mL×5瓶	-20℃
试剂二	粉剂	粉剂×2支	-20℃
	稀释液	0.5mL×2支	-20℃
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×5支	-20℃
	稀释液	1mL×5支	-20℃
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=60:1:5 的比例进行配制, 用多少配制多少, 现用现配			

二、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。

三、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 氧化提供 NAD⁺; 在线粒体中, MDH 还是决定 TCA 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。

四、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、离心管、蛋白测定试剂（组织及细胞样本用, 本公司有售）。

五、操作步骤：

1、10%匀浆液的制备：准确称取组织重量, 按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆, 2500 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液进行测定（具体参照实验方法学）根据各种组织中 MDH 活力的不同再用生理盐水按不同的比例将 10%的匀浆上清液稀释成 0.2%, 0.1%等不同的浓度待测

2、参考匀浆取样浓度：肝脏一般为 0.2%；肌肉一般为 0.5%。

3、操作过程：

- 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）。
- 将工作液, 37℃预温 3 分钟以上。
- 往相应编号的试管中加入 50μL 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 50μL 双蒸水, 加入 1mL 工作液, 其它操作与测定相同）
- 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（A₁ 值）, 在 1 分 20 秒时再次测定吸光度值（A₂ 值）;
- 求出 2 次吸光度差值（ΔA=A₁-A₂）。

[注]：空白管只须做 1~2 只（空白 OD 很稳定）；若 ΔA 测定/分钟<0.05 则需加大样本的浓度；否则影响检测结果；若 ΔA 测定/分钟>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。

六、计算公式：

1、定义：每毫克组织蛋白在本反应系统中 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：

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

6.2：底物的微摩尔消光系数；

d：比色光径, 0.5（cm）；

V_{反应}：反应液总体积, 1050（μL）；

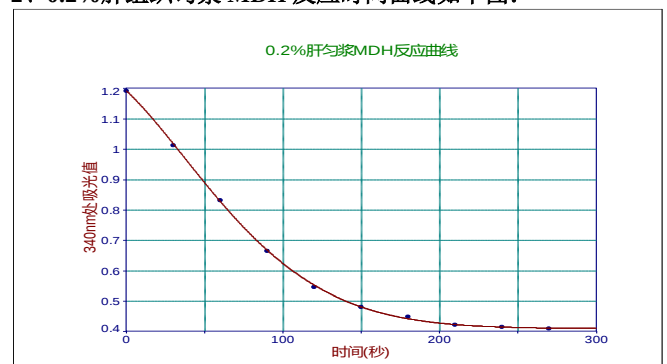
V_样：取样量, 50（μL）；

Cpr：匀浆蛋白浓度, mgprot/mL（prot 指蛋白）。

附录 I：小鼠肝组织匀浆反应曲线

1、检测步骤：取小鼠新鲜肝脏称重, 加生理盐水制成 10%的匀浆液, 再用生理盐稀释成 0.2%浓度按操作步骤检测。

2、0.2%肝组织匀浆 MDH 反应时间曲线如下图：



3、根据肝组织 MDH 反应曲线我们可以得出：在 2 分钟内, OD 的变化跟时间成线性关系。