



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

苹果酸脱氢酶(MDH)检测试剂盒(OAA 比色法)

简介:

苹果酸脱氢酶(Malate Dehydrogenase, MDH)是合成苹果酸的关键酶之一,催化苹果酸和草酰乙酸(OAA)的相互转化,参与众多生理代谢途径如 TCA 循环 C₄循环脂肪酸的氧化呼吸作用氮同化等,因此 MDH 在植物的生长发育中发挥着重要作用,广泛存在于线粒体、细菌细胞膜上,为三羧酸循环中的一种酶,由于酶的来源不同其某些性质也不尽相同。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。

源叶生物 苹果酸脱氢酶(MDH)检测试剂盒(OAA 比色法)检测原理是在弱碱条件下,以草酰乙酸(OAA)作为显色底物,OAA 在 MDH 催化下被 NADH 还原为苹果酸(Mal),每催化 1 分子 OAA 消耗 1 分子 NADH,通过分光光度比色法(分光光度计)测定 340nm 处吸光度的变化,计算出 NADH 的消耗速率进一步推算出苹果酸脱氢酶活性水平,主要用于检测植物样本、血清等中苹果酸脱氢酶活性。该试剂盒仅用于科研领域,不适用于临床诊断或其他用途。

组成:

名称 \ 编号	R30322 50T	Storage
试剂(A): MDH Lysis Buffer	250ml	4℃ 避光
试剂(B): PMSF	1ml	-20℃
试剂(C): MDH Assay Buffer	100ml	RT
试剂(D): NADH	1 支	-20℃
试剂(E): ddH ₂ O	10ml	RT
使用说明书	1 份	



自备材料:

- 1、研钵或匀浆器、离心管或试管
- 2、低温离心机、比色杯、分光光度计

操作步骤(仅供参考):

1、配制 MDH Lysis Buffer 工作液: 取出 MDH Lysis Buffer 和 PMSF, 恢复至室温, 按 MDH Lysis Buffer: PMSF=499: 1 的比例混合, 即为 MDH Lysis Buffer 工作液; 即配即用, 不宜久置, 否则蛋白酶抑制剂 PMSF 的效率会有所下降。

2、准备样品:

①植物样品: 取 1g 植物组织(根系)清洗干净, 切碎, 按植物组织: MDH Lysis Buffer 工作液=1g: 4ml 的比例, 加入预冷的 MDH Lysis Buffer 工作液, 冰浴情况下充分匀浆或研磨, 4℃ 12000g 离心 20min, 留取上清液即为苹果酸脱氢酶粗提液; 短期 4℃ 保存待用, 长期-20℃冻存待用。

②血浆、血清和尿液样品: 血浆、血清按照常规方法制备后可以直接用于该试剂盒的测定, -20℃冻存, 用于苹果酸脱氢酶的检测。

③细胞或组织样品: 取恰当细胞或组织裂解液, 如有必要用 MDH Lysis Buffer 工作液进行适当匀浆, 4℃ 12000g 离心 20min, 取上清液, -20℃冻存, 用于苹果酸脱氢酶的检测。

④高活性样品: 如果样品中含有较高活性的苹果酸脱氢酶, 可以使用 MDH Lysis Buffer 工作液进行恰当的稀释。

3、配制 NADH 工作液: 取出 1 支 NADH, 恢复至室温, 准确溶解于 10ml ddH₂O, 混匀, 4℃预冷备用, -20℃保存 1 周有效。

4、MDH 加样: 按照下表设置对照管(备选, 一般可以不设对照管)、测定管, 溶液应按照顺序依次加入, 并注意避免产生气泡。如果样品中的苹果酸脱氢酶活性过高, 可以减少样品用量或适当稀释后再进行测定, 样品的检测最好能设置平行管。



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

加入物(ml)	对照管(备选)	测定管
MDH Lysis Buffer 工作液	0.025	—
待测样品	—	0.025
MDH Assay Buffer	1.8	1.8

5、MDH 测定：加入 NADH 工作液 0.2ml，立即以分光光度计(1cm 光径比色杯)测定 340nm 处吸光度(记为 A_0)并同时计时，每隔 30s 测定 1 次 340nm 处吸光度，其中至 1min 时 340nm 处吸光度记为 A_1 ，记录其变化。建议加入 NADH 工作液后立即检测，加样时间越短越好，其反应基本在 1~2min 内，其后反应趋于平缓。

注意：该反应系统是利用速率变化，求得相应 OD 的变化，进而推算出 NADH 的消耗速率，再进一步推算出苹果酸脱氢酶的量，因此加入 NADH 工作液立即计时很重要，每次检测指标不宜过多，否则有可能由于操作时间有差异进而导致结果偏差。

计算：

苹果酸脱氢酶活性定义：每分钟 NADH 氧化吸光度变化 0.01 为 1 个酶活力单位。

液体样品 MDH(U/ml · min) = $\Delta A / (0.01 \times t \times 0.025)$

式中： $\Delta A = A_0 - A_1$ (如有必要，可再减去对照最初 1min 的吸光度变化量)

0.01 = 每分钟 NADH 氧化吸光度变化 0.01 为 1 个酶活力单位

t = 检测时间(min) = 1

0.025 = 待测样品体积(ml)

组织样品 MDH(U/g · min) = $\Delta A / (0.01 \times t \times W)$

式中： $\Delta A = A_0 - A_1$ (如有必要，可再减去对照最初 1min 的吸光度变化量)

0.01 = 每分钟 NADH 氧化吸光度变化 0.01 为 1 个酶活力单位

t = 检测时间(min) = 1

W = 待测样品鲜重或干重(g)

组织或植物粗酶液获得率(ml) = 上清液体积(ml) / 组织或植物质量 × 100%



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

注意事项:

- 1、实验材料应尽量新鲜，如取材后不立即使用，应存于-20~80℃。
- 2、待测样品中不能含有磷酸酶抑制剂，同时需避免反复冻融。
- 3、如果没有分光光度计，也可以使用普通的酶标仪测定，但应考虑酶标仪的最大检测体积。
- 4、该反应系统是利用速率变化，求得相应 OD 的变化，进而推算出 NADH 的消耗速率，再进一步推算出苹果酸脱氢酶的量，因此加入 NADH 工作液立即计时很重要，每次检测指标不宜过多，否则有可能由于操作时间有差异进而导致结果偏差。
- 5、酶液的稀释度应尽量控制在 A_{340}/min 下降范围在 0.1~0.2 之间，以便减少实验误差。
- 6、 ΔA 为反应最初 1min 内 340nm 处吸光度变化的绝对量，如有必要可减去对照液最初 1min 的吸光度变化量。
- 7、如果所测待测样品的浓度过高，应用 MDH Lysis buffer 工作液稀释样品后重新测定。

有效期: 6 个月有效。