苹果酸脱氢酶(MDH)检测试剂盒(OAA 微板法)

产品简介：

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 C_4 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。

Yuanye 苹果酸脱氢酶(MDH)检测试剂盒(OAA 微板法)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(酶标仪)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。

产品组成：

编号 / 名称	R30321 100T	Storage
试剂(A): MDH Lysis Buffer	250ml	4℃ 避光
试剂(B): PMSF	1ml	-20℃
试剂(C): MDH Assay Buffer	20ml	-20℃
试剂(D): NADH	1 支	-20℃
试剂(E): ddH_2O	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、低温离心机、96 孔板、酶标仪

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 0.5g 植物组织(根系)清洗干净，切碎，按植物组织：MDH Lysis Buffer 工作液=0.5g：2ml 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本试剂盒的测定，-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 ddH_2O，混匀，4℃预冷备用，-20℃保存 1 周有效。注意：该 NADH 工作液为过量。

4、MDH 加样：按照下表设置对照孔(备选，一般可以不设对照孔)、测定孔，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孔。

加入物(μl)	对照孔(备选)	测定孔
MDH Lysis Buffer 工作液	2.5	—
待测样品	—	2.5
MDH Assay Buffer	180	180

5、MDH 测定：加入 NADH 工作液 20μl，立即以酶标仪测定 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。Yuanye 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：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)=$\Delta A/(0.01\times t\times 0.005)$

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

0.005=待测样品体积(ml)

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%

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、 如果没有酶标仪，也可以使用普通的分光光度计测定，但应考虑分光光度计的最小检测体积。

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、 Δ*A* 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。

8、 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

9、 试剂开封后请尽快使用，以防影响后续实验效果。

有效期：6 个月有效。低温运输，按要求保存。