

苹果酸脱氢酶 (MDH) 检测试剂盒 (OAA微板法)

产品货号: BA1689

产品规格: 100T

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,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。

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, 该试剂盒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, 不宜用于临床诊断或其他用途。

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
试剂(A): MDH Lysis buffer	250ml	4℃ 避光
试剂(B): PMSF	1ml	-20℃
试剂(C): MDH Assay buffer	20ml	室温
试剂(D): NADH	1 支	-20℃
试剂(E): ddH ₂ O	10ml	室温

需自备的仪器和用品:

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:

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 ddH₂O, 混匀, 4℃ 预冷备用, -20℃



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

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(μ l)	对照孔(备选)	测定孔
MDH Lysis buffer 工作液	5	-
待测样品	-	5
MDH Assay buffer	180	180

5. MDH 测定：加入 NADH 工作液 20 μ l，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。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)= $\Delta A / (0.01 \times t \times 0.005)$

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)

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 $\times 100\%$

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 $^{\circ}$ C。
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. 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。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com