

## 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<sub>4</sub>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,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

名称 \ 编号	ADS055TE0	Storage
	100T	
试剂(A): MDH Lysis Buffer	250ml	4°C 避光
试剂(B): PMSF	1ml	-20°C
试剂(C): MDH Assay Buffer	20ml	-20°C
试剂(D): NADH	1支	-20°C
试剂(E): ddH <sub>2</sub> O	10ml	RT
使用说明书	1份	

### 自备材料

- 1、研钵或匀浆器
- 2、离心管或试管
- 3、低温离心机
- 4、96孔板

## 5、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ADH 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<sub>2</sub>O，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	5	—
待测样品	—	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<sub>0</sub>)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<sub>1</sub>，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：每分钟NADH氧化吸光度变化0.01为1个酶活力单位。

$$\text{液体样品MDH(U/ml} \cdot \text{min)} = \Delta A / (0.01 \times t \times 0.005)$$

$$\text{组织样品MDH(U/g} \cdot \text{min)} = \Delta A / (0.01 \times t \times W)$$

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 $A_{340}/\text{min}$ 下降范围在0.1~0.2之间，以便减少实验误差。
- 6、 $\Delta A$ 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。

**有效期：**6个月。低温运输，按要求保存。