

苹果酸脱氢酶 (MDH) 测定试剂盒

(货号: BC107 测组织 紫外法 50 管/48 样)

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°C
试剂二	粉剂	粉剂×2支	-20°C
	稀释液	0.5mL×2支	-20°C
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°C
	稀释液	1mL×5支	-20°C
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; 在细胞溶质中, 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、操作步骤:

- 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
- 参考匀浆取样浓度:** 肝脏一般为 0.2%; 肌肉一般为 0.5%。
- 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°C 预温 3 分钟以上。
 - 往相应编号的试管中加入 50 μ L 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 50 μ L 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 (A_1 值), 在 1 分 20 秒时再次测定吸光度值 (A_2 值);

e、求出 2 次吸光度差值 ($\Delta A=A_1-A_2$)。

[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。

五、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 1 μ mol 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);

$V_{\text{反应}}$: 反应液总体积, 1050 (μ L);

$V_{\text{样}}$: 取样量, 50 (μ L);

Cpr: 匀浆蛋白浓度, mgprot/mL (prot 指蛋白)。

3、计算举例:

例 1: 取小鼠 0.2% 的肝组织匀浆, 取 50 μ L 按操作表进行检测, 测得: 测定管 OD₁ 为 1.088, OD₂ 为 0.905; 空白管 OD₁ 为 1.100, OD₂ 为 1.098; 同时测得 0.2% 匀浆蛋白浓度为 0.255mg/mL, 计算结果为:

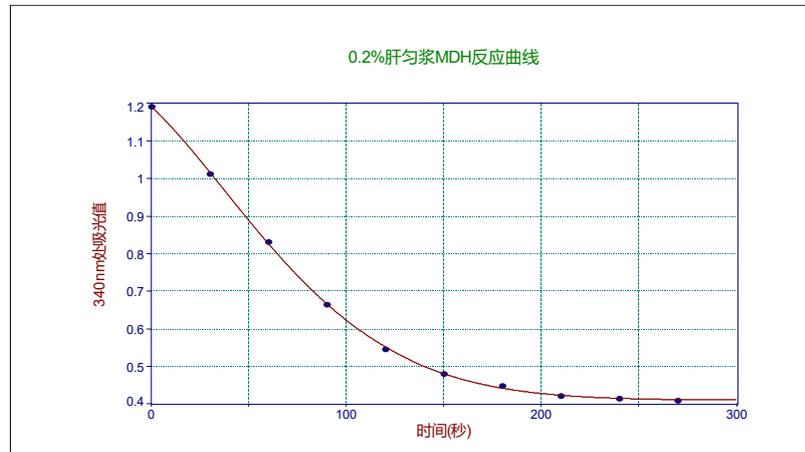
$$\begin{aligned} \text{小鼠肝MDH活力 (U/mgprot)} &= \frac{0.183 - 0.002}{6.2 \times 0.5} \times \frac{1050}{50} \div 0.255 \\ &= 4.81\text{U/mgprot} \end{aligned}$$

例 2: 取小鼠 0.5% 的肌肉组织匀浆, 取 50 μ L 按操作表进行检测, 测得: 测定管 OD₁ 为 1.291, OD₂ 为 1.051; 空白管 OD₁ 为 1.100, OD₂ 为 1.098; 同时测得 0.5% 肌肉匀浆蛋白浓度为 0.220mg/mL, 计算结果为:

$$\begin{aligned} \text{小鼠肌肉MDH活力 (U/mgprot)} &= \frac{0.240 - 0.002}{6.2 \times 0.5} \times \frac{1050}{50} \div 0.220 \\ &= 7.33\text{U/mgprot} \end{aligned}$$

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。