

苹果酸脱氢酶 (MDH) 测试盒/测组织

紫外比色法 50 管/48 样

一、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。

二、试剂盒组成与配制:

	试剂组成	试剂装量	保存条件
试剂一	液体	12ml×5 瓶	-20℃保存 6 个月
试剂二	粉剂	粉剂×2 支	-20℃保存 6 个月
	稀释液	0.5ml×2 支	-20℃保存 6 个月
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, 充分混匀后即试剂二应用液, 现用现配。			
试剂三	粉剂	粉剂×5 支	-20℃保存 6 个月
	稀释液	1ml×5 支	-20℃保存 6 个月
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、操作步骤:

1、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。

2、参考取样浓度: 肝脏匀浆一般为 0.2%; 肌肉匀浆一般为 0.5% (建议先做预实验确定)。

3、操作过程:

a、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)。

b、将工作液, 37℃预温 3 分钟以上。

c、往相应编号的试管中加入 50 μl 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 μl 双蒸水, 加入 1ml 工作液, 其它操作与测定相同)

d、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 (A1 值), 在 1 分 20 秒时再次测定吸光度值 (A2 值);

e、求出 2 次吸光度差值 ($\Delta A = A1 - A2$)。

[注]: 空白管只须做 1~2 只 (空白 OD 很稳定)

若 ΔA 测定/分 < 0.05 则需加大样本的浓度; 否则影响检测结果。

若 ΔA 测定/分 >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。

四、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 $1 \mu\text{mol}$ 的底物转变成产物定义为 1 个酶活力单位。

2、计算公式：

$$\text{MDH 活力} = \frac{\text{测定}\Delta A - \text{空白}\Delta A}{6.2 * \text{比色光径}(0.5\text{cm})} \times \frac{\text{反应液总体积}(1.05\text{ml})}{\text{取样量}(0.05\text{ml})} \times \text{样本测试前} \div \text{待测样本蛋白浓度} \\ (\text{U} / \text{mgprot}) \quad \text{稀释系数} \quad (\text{mgprot} / \text{ml})$$

* 6.2 : 底物的微摩尔消光系数

测定管 ΔA ：20 秒时测定管的吸光度 OD 减去 1 分 20 秒时的测定管吸光度 OD；

空白管 ΔA ：20 秒时空白管的吸光度 OD 减去 1 分 20 秒时的空白管吸光度 OD。

公司地址：南京市玄武区中央路

258-27

号新立基大厦

邮政编码：210009

E-Mail: njcbio@vip.163.com

联系电话：025-83360321、83360969、83551389

技术支持：025-83360272

传真号码：025-83227943