



NADP-苹果酸脱氢酶检测试剂盒

NADP-MDH Assay Kit

微量法

产品编号: AK375M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES375	100 mL×1 瓶	4℃保存；
AK375-A	20 mL×1 瓶	4℃避光保存；
AK375-B	粉剂×1 支	-20℃保存；临用前加入 300μL 蒸馏水；剩余试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；
AK375-C	粉剂×1 支	-20℃保存；临用前加入 300μL 蒸馏水；剩余试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: MDH (EC 1.1.1.37) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 线粒体中 MDH 是 TCA 循环的关键酶之一, 催化苹果酸形成草酰乙酸; 相反, 胞浆中 MDH 催化草酰乙酸形成苹果酸。草酰乙酸是重要的中间产物, 连接多条重要的代谢途径。因此, 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, NADP-MDH 主要存在于真核细胞中。

原理: NADP-MDH 催化 NADPH 还原草酰乙酸生成苹果酸, 导致 340nm 处光吸收下降。

自备用品:

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、冰和蒸馏水。

样本准备:

1. 细菌、细胞或组织样品的制备:

细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个) : ES375 体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL ES375), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4℃离心 10min, 取上清置冰上待测。

组织: 按照组织质量 (g) : ES375 体积(mL)为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL ES375), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

- 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 将 AK375-A 在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 10min 以上。
- 操作表:

试剂名称	测定管 (μL)
样本	5
AK375-A	190
AK375-B	2.5
AK375-C	2.5

将上述试剂按顺序加入 1 mL 石英比色皿中，混匀后立即在 340 nm 波长下记录初始吸光度 A1 和反应 1min 后的吸光度 A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

注意：若 A1-A2 大于 0.5，需将样本用提取液稀释，使 A1-A2 小于 0.5，可提高检测灵敏度。计算公式中乘以相应稀释倍数。

NADP-MDH 活性计算：

a. 用微量比色皿测定：

1. 血清（浆）NADP-MDH 活力的计算：

单位定义：每毫升血清（浆）每分钟消耗 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 6430 \times \Delta A$$

2. 组织、细菌或细胞中 NAD-MDH 活力的计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 6430 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{总}}) \div T = 6430 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{总}} \times 500) \div T = 12.86 \times \Delta A$$

注：V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；

V 样：加入样本体积，0.005 mL；V 总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，1 min；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：细胞或细菌总数，500 万。

b. 用 96 孔板测定：

1. 血清（浆）NADP-MDH 活力的计算：

单位定义：每毫升血清（浆）每分钟消耗 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 12860 \times \Delta A$$

2. 组织、细菌或细胞中 NAD-MDH 活力的计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 12860 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{总}}) \div T = 12860 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{总}} \times 500) \div T = 25.72 \times \Delta A$$

注：V 反总：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADPH 摆尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：比色皿光径，0.5cm；

V 样：加入样本体积，0.005 mL；V 总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，1 min；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：细胞或细菌总数，500 万。