



NADP-苹果酸脱氢酶检测试剂盒

NADP-MDH Assay Kit

紫外分光光度法

产品编号：AK375U

产品规格：50T/48S

产品组成及保存条件：

编号	规格	储存条件
ES375	60 mL×1 瓶	4℃保存；
AK375-A	50 mL×1 瓶	4℃避光保存；
AK375-B	粉剂×2 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×2 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、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1 mL 石英比色皿和蒸馏水。

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（在 1 mL 石英比色皿中加入下面试剂）

试剂名称	测定管 (μL)
样本	20
AK375-A	760
AK375-B	10
AK375-C	10

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：

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。

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

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。

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

（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。

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

（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。

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

注：V 反总：反应体系总体积， 8×10^{-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，0.02 mL；V 样总：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。