

# NADP-苹果酸脱氢酶（NADP-MDH）活性检测试剂盒 （紫外分光光度法）

产品货号：BA1224

产品规格：50管/48样

## 产品简介：

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。

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。

**注意：实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

## 产品内容：

提取液：液体50mL×1瓶，在4℃保存；

试剂一：液体40mL×1瓶，在4℃保存；

试剂二：粉剂×2支，-20℃保存；临用前加入250μL双蒸水，用不完的试剂仍-20℃保存；

试剂三：粉剂×2支，-20℃保存；临用前加入300μL双蒸水，用不完的试剂仍-20℃保存。

## 需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、1mL石英比色皿、研钵/匀浆器、蒸馏水。

## 操作步骤：

### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）：

细菌或培养细胞：收集细菌或细胞到离心管内，弃上清，按照每200万细菌或细胞加入400μL提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率20%，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：称取约0.1g组织，加入1mL提取液进行冰浴匀浆；8000g 4℃离心10min，取上清，置冰上待测。

血清（浆）样品：直接检测。

### 二、测定步骤：

1. 分光光度计预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。
2. 试剂一置于37℃水浴中预热15min以上（保证无沉淀）。
3. 操作表：

试剂名称（μL）	测定管	空白管
样本	20	-
蒸馏水	-	20
试剂一	760	760
试剂二	10	10



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

试剂三	10	10
-----	----	----

将上述试剂按顺序加入1mL石英比色皿中，充分吹打混匀后立即记录340nm波长下初始吸光度A1和反应1min后的吸光度A2，计算 $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ ， $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$ ，计算 $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。（空白管测1-2管即可）

### 三、NADP-MDH活力单位的计算：

#### 1. 血清（浆）NADP-MDH活力的计算

单位的定义：每毫升血清（浆）在反应体系中每分钟消耗1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

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

$\epsilon$ : NADPH消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ;  $d$ : 比色皿光径,  $1\text{cm}$ ;  $V_{\text{反总}}$ : 反应总体积,  $0.0008\text{L}$ ;  $V_{\text{样}}$ : 加入样品体积,  $0.02\text{mL}$ ;  $T$ : 反应时间,  $1\text{min}$ ;  $10^9$ : 单位换算系数,  $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

#### 2. 组织中NADP-MDH活力的计算:

##### (1) 按样本蛋白浓度计算:

单位的定义：每mg组织蛋白在反应体系中每分钟消耗1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

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

##### (2) 按样本鲜重计算:

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟消耗1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

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

$\epsilon$ : NADPH消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ;  $d$ : 比色皿光径,  $1\text{cm}$ ;  $V_{\text{反总}}$ : 反应总体积,  $0.0008\text{L}$ ;  $V_{\text{样}}$ : 加入样品体积,  $0.02\text{mL}$ ;  $V_{\text{提取}}$ : 提取液体积,  $1\text{mL}$ ;  $C_{\text{pr}}$ : 样本蛋白浓度,  $\text{mg/ml}$ ;  $W$ : 样本鲜重,  $\text{g}$ ;  $T$ : 反应时间,  $1\text{min}$ ;  $10^9$ : 单位换算系数,  $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

#### 3. 细菌或培养细胞中NADP-MDH活力的计算:

单位的定义：每1万个细菌或细胞在反应体系中每分钟消耗1nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH (U/10}^4\text{cell)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (200 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T \times 10^9 = 12.8 \times \Delta A$$

$\epsilon$ : NADPH消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ;  $d$ : 比色皿光径,  $1\text{cm}$ ;  $V_{\text{反总}}$ : 反应总体积,  $0.0008\text{L}$ ;  $V_{\text{样}}$ : 加入样品体积,  $0.02\text{mL}$ ;  $V_{\text{提取}}$ : 细胞提取液体积,  $0.4\text{mL}$ ;  $200$ : 细菌或细胞数量,  $200\text{万}$ ;  $T$ : 反应时间,  $1\text{min}$ ;  $10^9$ : 单位换算系数,  $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

### 注意事项:

1. 样本的提取必须在 $0-4^\circ\text{C}$ 中操做完成，以防止酶变性失活。
2. 实验时，试剂二、试剂三和样本在冰上放置，以免变性和失活。试剂一 $37^\circ\text{C}$ 放置。
3. 建议一人加样一人比色。尽量保持反应温度为 $37^\circ\text{C}$ 。



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com