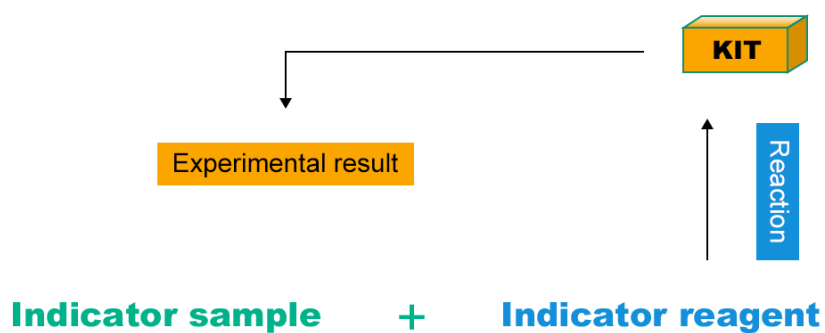


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0311

Size: 100T/96S

NADP-苹果酸脱氢酶 (NADP-MDH) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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。

二、测定原理:

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。

三、需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、微量石英比色皿/96 孔板 (ZC-1036: UV 板) 和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存	临用前加入 500μL 双蒸水, 用不完的试剂仍-20℃保存
试剂三	粉剂×1 支	-20℃保存	临用前加入 600μL 双蒸水, 用不完的试剂仍-20℃保存

五、操作步骤：

● 粗酶液提取：

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 400 μ L 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 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 离心 10min，取上清，置冰上待测。

血清（浆）样品：直接检测。

● 测定步骤：

1、酶标仪调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、试剂一置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中预热 30min 以上（保证无沉淀）

3、操作表：

试剂名称 (μ L)	测定孔	空白管
样本	5	—
蒸馏水	—	5
试剂一	185	185
试剂二	5	5
试剂三	5	5

将上述试剂按顺序加微量石英比色皿/石英 96 孔板中，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 $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。

六、NADP-MDH 活力单位的计算：

● 按微量石英比色皿计算：

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。

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

ε : NADPH 消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm ; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.0002L ; $V_{\text{样}}$: 加入样品体积, 0.005mL ; T : 反应时间, 1min 。

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。

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

(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。

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

ε : NADPH 消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm ; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.0002L ;
 $V_{\text{样}}$: 加入样品体积, 0.005mL ; $V_{\text{提取}}$: 提取液体积, 1mL ; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/ml ; W : 样本鲜重, g ; T : 反应时间, 1min 。

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 1 nmol 的NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div \epsilon \div d \times V_{\text{反总}} \div (200 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{提取}}) \div T \times 10^9$$
$$= 13 \times \Delta A \div W$$

ϵ : NADPH 消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm ; $V_{\text{反总}}$: 反应总体积, 0.0002L ; $V_{\text{样}}$: 加入样品体积, 0.005mL ; $V_{\text{提取}}$: 细胞提取液体积, 0.4mL ; 200: 200 万细胞; T : 反应时间, 1min 。

4. 按96 孔板计算：将上述公式中的比色皿光径 $d=1\text{cm}$ 改为石英 96 孔板光径 $d=0.5\text{cm}$ 进行计算。

七、注意事项：

- 1、粗酶液的提取必须在 $0^\circ\text{C} - 4^\circ\text{C}$ 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°C 放置。
- 3、建议一人加样一人比色。因时间监测范围小，不推荐用 96 孔 UV 板同时测多个样本。
- 4、空白管测 1-2 管即可。