

NADP-苹果酸脱氢酶 (NADP-MDH) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1225

产品规格: 100管/96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100mL×1瓶, 在4℃保存;

试剂一: 液体20mL×1瓶, 在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。

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 (UV板)、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. 酶标仪/紫外分光光度计预热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30min以上 (保证无沉淀)。

3. 操作表:

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
样本	5	-
蒸馏水	-	5
试剂一	185	185



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 $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。（空白管测1-2管即可）

三、NADP-ME活性计算：

a.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。

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

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 ; 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。

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

(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。

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

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 ; Cpr : 样本蛋白浓度, mg/ml ; W : 样本鲜重, g ; T : 反应时间, 1min ; 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。

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

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 ; 10^9 : 单位换算系数, $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

b.按96孔板计算:

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

注意事项:

1. 样本的提取必须在 $0^{\circ}\text{C} - 4^{\circ}\text{C}$ 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. 用分光光度计时，当初始值小于0.7或者 ΔA 大于0.5时，建议稀释后测量。



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