

NADP-苹果酸脱氢酶(NADP-MDH) 试剂盒说明书

(货号: PB1024F48 分光法 48 样)

有效期: 3 个月

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。

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。

需自备的仪器和用品:

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。

试剂的组成和配制:

试剂一、提取液 60 mL×1 瓶, 在 4℃ 保存;

试剂二、液体 50 mL×1 瓶, 在 4℃ 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;

试剂四、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。

样本测定的准备:

1、细菌、细胞或组织样品的制备:

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 试剂一进行冰浴匀浆; 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、血清(浆)样品: 直接检测。

测定操作表:

试剂名称 (μL)	测定孔
样本	20
试剂二	760
试剂三	10
试剂四	10

将上述试剂按顺序加入 1 mL 石英比色皿中, 混匀后在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种), 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 $\Delta A = A1 - A2$ 。

注意事项:

1、粗酶液的提取必须在 0℃ - 4℃ 中操作完成, 以防止酶变性失活。

2、实验时, 试剂三、试剂四和样本在冰上放置, 以免变性和失活。试剂二 37℃ 或 25℃ 室温放置。

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 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 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 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 6431 \times \Delta A \div Cpr$$

（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 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 6431 \times \Delta A \div W$$

（3）按细菌或细胞密度计算：

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。

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

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，1 cm；V 样：加入样本体积，0.002 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，1 min；W：样品质量，g；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：细胞或细菌总数，500 万。