

NADP-苹果酸脱氢酶 (NADP-MDH) 活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号: AC10232

规格: 50T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

| 试剂名称 | 规格 | 保存条件 |
|------|--------------|---------|
| 提取液 | 液体 50 mL×1 瓶 | 4°C保存 |
| 试剂一 | 液体 40 mL×1 瓶 | 4°C保存 |
| 试剂二 | 粉剂×2 支 | -20°C保存 |
| 试剂三 | 粉剂×2 支 | -20°C保存 |

溶液的配制:

1. 试剂二: 临用前加入 250 μ L 双蒸水, 用不完的试剂仍-20°C保存;
2. 试剂三: 临用前加入 300 μ L 双蒸水, 用不完的试剂仍-20°C保存。

产品说明:

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。

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)

- 1、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°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 2、组织: 称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆; 8000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 3、血清 (浆) 样本: 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°C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 |
| 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 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

ϵ : NADPH 消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反应总}}$: 反应总体积, 0.0008L; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02mL; 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。

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

(2) 按样本质量计算:

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。

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

ϵ : NADPH 消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反应总}}$: 反应总体积, 0.0008L; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02mL; $V_{\text{提取}}$: 提取液体积, 1mL; W : 样本质量, g; C_{pr} : 样本蛋白浓度, mg/mL; 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。

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

ϵ : NADPH 消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反应总}}$: 反应总体积, 0.0008L; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.02mL; $V_{\text{提取}}$: 细胞提取液体积, 0.4mL; 200: 细菌或细胞数量, 200万; T : 反应时间, 1min; 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°C-4°C 中操作完成，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。尽量保持反应温度为 37°C。

实验实例:

1、取 0.1g 大鼠心脏组织加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清后按照测定步骤操作，测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=0.694-0.628=0.066， ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.652-0.643=0.009， $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.057，按样本鲜重计算酶活得：

$\text{NADP-MDH (U/g 鲜重)} = 6430 \times \Delta A \div W = 6430 \times 0.057 \div 0.1 = 3665.1 \text{ U/g 鲜重}$ 。

参考文献:

[1] Yao Y X, Li M, Zhai H, et al. Isolation and characterization of an apple cytosolic malate dehydrogenase gene reveal its function in malate synthesis[J]. Journal of plant physiology, 2011, 168(5): 474-480.