

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：BC1050

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，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 50 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×2 支	-20℃保存

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入 250 μ L 蒸馏水，用不完的试剂仍-20℃保存；
2. 试剂三：临用前加入 300 μ L 蒸馏水，用不完的试剂仍-20℃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。

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，超声破碎细菌或细胞（功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次），8000g 4℃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℃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℃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 ΔA 空白=A1 空白-A2 空白， ΔA 测定=A1 测定-A2 测定，计算 $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 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。

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

ϵ : NADPH消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm; d : 1mL石英比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 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, 6.22×10^3 L/mol/cm; d : 1mL石英比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 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, 6.22×10^3 L/mol/cm; d : 1mL石英比色皿光径, 1cm; $V_{\text{反总}}$: 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。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：

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

相关发表文献：

[1] Zheng L, Liu Q, Wu R, Songbuerbatu, Zhu M, Dorjee T, Zhou Y, Gao F. The alteration of proteins and metabolites in leaf apoplast and the related gene expression associated with the adaptation of *Ammopiptanthus mongolicus* to winter freezing stress. *Int J Biol Macromol*. 2023 Jun 15; 240:124479. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023. 124479. Epub 2023 Apr 16. PMID: 37072058.

[2] Hu Q, Xu J, Wang L, Yuan Y, Luo R, Gan M, Wang K, Zhao T, Wang Y, Han T, Wang JB. SUCLG2 Regulates Mitochondrial Dysfunction through Succinylation in Lung Adenocarcinoma. *Adv Sci (Weinh)*. 2023 Dec;10(35): e2303535. doi: 10.1002/advs.202303535. Epub 2023 Oct 30. PMID: 37904651; PMCID: PMC10724390.

[3] An L, Gong N, Hu T, Wang L, Zhang M, Huang M, Chen G, Tang T, Liu X. Study on Antibacterial Activity and Mechanism of Improved Dian Dao San Against *Cutibacterium acnes* (C. acnes). *Infect Drug Resist*. 2023 Aug 1; 16:4965-4975. doi: 10.2147/IDR.S419161. PMID: 37546368; PMCID: PMC10404043.

[4] Zhang J, Li Q, Lu Y, Guan X, Liu J, Xu N, Cai C, Li X, Nan B, Liu J, Wang Y. Astaxanthin overproduction of *Phaffia rhodozyma* PR106 under titanium dioxide stress by transcriptomics and metabolic regulation analysis. *Bioresour Technol*. 2021 Dec; 342:125957. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125957. Epub 2021 Sep 15. PMID: 34555753.

[5] Zhang X, Xue W, Qi L, Zhang C, Wang C, Huang Y, Wang Y, Peng L, Liu Z. Malic acid inhibits accumulation of cadmium, lead, nickel and chromium by down-regulation of OsCESA and up-regulation of OsGLR3 in rice plant. *Environ Pollut*. 2024 Jan 15; 341:122934. doi: 10.1016/j.envpol.2023.122934. Epub 2023 Nov 13. PMID: 37967709.

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.

相关系列产品：

BC0310/BC0315 辅酶I NAD (H) 含量检测试剂盒

BC1030/BC1035 NAD 激酶 (NADK) 活性检测试剂盒

BC0630/BC0635 NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒

BC1130/BC1135 NAD-苹果酸酶 (NAD-ME) 活性检测试剂盒

