

NADP-苹果酸脱氢酶（NADP-MDH）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC1055

规格：100T/96S

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 100 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×1 支	-20℃保存

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入 500 μ L 蒸馏水，用不完的试剂仍-20℃保存；
2. 试剂三：临用前加入 600 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/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）

- 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 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、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	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 96UV 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-MDH活力单位的计算

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 ：微量石英比色皿光径，1cm； $V_{\text{反总}}$ ：反应总体积，0.0002L； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，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。

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

(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， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ：微量石英比色皿光径，1cm； $V_{\text{反总}}$ ：反应总体积，0.0002L； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.005mL； $V_{\text{提取}}$ ：提取液体积，1mL； C_{pr} ：样本蛋白浓度，mg/ml； W ：样本质量，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。

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

ϵ ：NADPH消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ； d ：微量石英比色皿光径，1cm； $V_{\text{反总}}$ ：反应总体积，0.0002L； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.005mL； $V_{\text{提取}}$ ：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， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

b.按96孔板计算：

将上述公式中的微量石英比色皿光径 $d=1\text{cm}$ 改为石英96孔UV板光径 $d=0.6\text{cm}$ 进行计算。

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。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。

实验实例：

1、取 0.1g 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，用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=0.7173-0.6399=0.0774， ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.6583-0.6562=0.0021， $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.0753，按样本质量计算酶活得：

$\text{NADP-MDH (U/g 质量)} = 6430 \times \Delta A \div W = 6430 \times 0.0753 \div 0.1 = 4841.79 \text{ U/g 质量}$ 。

2、取 5 μ L 血清直接按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定= 0.6934-0.6854=0.008， ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.6583-0.6562=0.0021， $\Delta A = \Delta A$ 测定管- ΔA 空白管=0.0059，按血清/血浆体积计算酶活得：

$\text{NADP-MDH (U/mL)} = 6430 \times \Delta A = 6430 \times 0.0059 = 37.937 \text{ U/mL}$ 。

相关发表文献：

[1] Wang Z, Wang X, Sheng X, Zhao L, Qian J, Zhang J, Wang J. Unraveling the Antibacterial Mechanism of Plasma-Activated Lactic Acid against *Pseudomonas ludensis* by Untargeted Metabolomics. *Foods*. 2023 Apr 10;12(8):1605. doi: 10.3390/foods12081605. PMID: 37107401; PMCID: PMC10137701.

[2] Ali MM, Anwar R, Rehman RNU, Ejaz S, Ali S, Yousef AF, Ercisli S, Hu X, Hou Y, Chen F. Sugar and acid profile of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.), enzymes assay and expression profiling of their metabolism-related genes as influenced by exogenously applied boron. *Front Plant Sci*. 2022 Oct 20; 13:1039360. doi: 10.3389/fpls.2022.1039360.

[3] Chen W, Zhou M, Zhao M, Chen R, Tigabu M, Wu P, Li M, Ma X. Transcriptome analysis provides insights into the root response of Chinese fir to phosphorus deficiency. *BMC Plant Biol*. 2021 Nov 10;21(1):525. doi: 10.1186/s12870-021-03245-6. PMID: 34758730; PMCID: PMC8579613.

[4] Pan H, Xiao Y, Xie A, Li Z, Ding H, Yuan X, Sun R, Peng Q. The antibacterial mechanism of phenylacetic acid isolated from *Bacillus megaterium* L2 against *Agrobacterium tumefaciens*. *PeerJ*. 2022 Nov 8; 10: e14304. doi: 10.7717/peerj.14304. PMID: 36389424; PMCID: PMC9651047.

[5] 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.

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

