NADP-苹果酸脱氢酶（NADP-MDH）试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

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/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

试剂一、提取液100 mL×1瓶，在4℃保存；

试剂二、液体20 mL×1瓶，在4℃保存；

试剂三、粉剂×1瓶，-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：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（104个）：试剂一体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL试剂一），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率20%或200W，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：按照组织质量（g）：试剂一体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约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。

测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，蒸馏水调零。

2、检测工作液的配制：用时在试剂三中加入19mL试剂二和0.5mL蒸馏水，充分混匀待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

3、测定前将检测工作液在37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴10min以上。

4、在微量石英比色皿或96孔板中加入5μL样本和195μL工作液，混匀后立即记录340nm处20s时的吸光值A1和 1min20s后的吸光值A2，计算ΔA=A1-A2。

注意：若A1-A2大于0.5，需将酶液用提取液稀释，使A1-A2小于0.5，可提高检测灵敏度。计算公式中乘以相应稀释倍数。

NADP-MDH活力单位的计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、血清（浆）NADP-MDH活力的计算

单位的定义：每毫升血清（浆）每分钟消耗1 nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

NADP-MDH（nmol/min/mL）=[ΔA×V反总÷（ε×d）×109]÷V样÷T=6430×ΔA

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组织蛋白每分钟消耗1 nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

NADP-MDH（nmol/min/mg prot）=[ΔA×V反总÷（ε×d）×109]÷(V样×Cpr) ÷T=6430×ΔA÷Cpr

（2）按样本鲜重计算：

单位的定义：每g组织每分钟消耗1 nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

NADP-MDH（nmol/min/g 鲜重）=[ΔA×V反总÷（ε×d）×109]÷（W ×V样÷V样总）÷T =6430×ΔA÷W

（3）按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每1万个细菌或细胞每分钟消耗1 nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

NADP-MDH（nmol/min/104 cell）=[ΔA×V反总÷（ε×d）×109]÷（V样÷V样总×500）÷T=12.86×ΔA

V反总：反应体系总体积，2×10-4 L；ε：NADPH摩尔消光系数，6.22×103 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.005 mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，1 min；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：细胞或细菌总数，500万。

b.用96孔板测定的计算公式如下

1、血清（浆）NADP-MDH活力的计算

单位的定义：每毫升血清（浆）每分钟消耗1 nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

NADP-MDH（nmol/min/mL）=[ΔA×V反总÷（ε×d）×109]÷V样÷T=12860×ΔA

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组织蛋白每分钟消耗1 nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

NADP-MDH（nmol/min/mg prot）=[ΔA×V反总÷（ε×d）×109]÷(V样×Cpr) ÷T=12860×ΔA÷Cpr

（2）按样本鲜重计算：

单位的定义：每g组织每分钟消耗1 nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

NADP-MDH（nmol/min/g 鲜重）=[ΔA×V反总÷（ε×d）×109]÷（W× V样÷V样总）÷T =12860×ΔA÷W

（3）按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每1万个细菌或细胞每分钟消耗1 nmol的NADPH定义为一个酶活力单位。

NADP-MDH（nmol/min/104 cell）=[ΔA×V反总÷（ε×d）×109]÷（500×V样÷V样总）÷T=25.72×ΔA

V反总：反应体系总体积，2×10-4 L；ε：NADPH摩尔消光系数，6.22×103 L / mol /cm；d：96孔板光径，0.5cm；V样：加入样本体积，0.005 mL；V样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，1 min；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：细胞或细菌总数，500万。