

NADP-苹果酸脱氢酶 (NADP-MDH) 试剂盒说明书

(货号: G0820W 微板法 96 样)

一、产品简介:

苹果酸脱氢酶广泛存在于动植物、微生物和培养细胞中,依据需要的辅酶不同,可分为:NAD-MDH和NADP-MDH,前者主要存在于线粒体和胞质中,后者存在于某些微生物和植物叶绿体中;苹果酸脱氢酶与多条生理代谢途径密切相关: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。

NADP-MDH(EC 1.1.1.82)催化NADPH还原草酰乙酸生成苹果酸,使NADPH在340nm处光吸收下降,进而通过340nm处光吸收的下降速率计算得到NADP-MDH的酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂×2 支	-20°C保存	临用前甩几下或离心使试剂落到底部,每支加0.9mL蒸馏水溶解,用不完的试剂分装后-20°C保存,禁止反复冻融,三天内用完。
试剂二	液体 18mL×1 瓶	4°C保存	
试剂三	粉剂×2 支	-20°C保存	临用前甩几下或离心使试剂落到底部,每支加0.9mL蒸馏水溶解,三天内用完。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、蒸馏水。

四、NADP-苹果酸脱氢酶 (NADP-MDH) 活性测定:

建议正式实验前选取2个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!

1、样本制备:

① 组织样本:

称取约0.1g组织,加入1mL提取液,进行冰浴匀浆。12000rpm 4°C离心10min,取上清,置冰上待测。

【注】:若增加样本量,可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为1:5~10的比例提取

② 细菌/细胞样本:

先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取500万细菌或细胞加入1mL提取液;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);12000rpm 4°C离心10min,取上清,置冰上待测。(或按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为1000~2000:1的比例进行提取)

【注】:若增加样本量,可按细菌/细胞数量(10^4 个):提取液(mL)为1000~5000:1的比例进行提取

③ 液体样本:直接检测。若浑浊,离心后取上清检测。

2、上机检测:

① 酶标仪预热30min以上,调节波长至340nm,设定温度25°C。

② 测定前将溶好的试剂一在25°C水浴锅中孵育10min以上。

③ 在96孔板中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	15
试剂二	160
试剂三	15
混匀, 30°C下立即于 340nm 下读取 A1, 1min 后读取 A2, ΔA=A1-A2。	

五、结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T = 6430.9 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织中每分钟消耗 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 6430.9 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 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。

$$\text{NADP-MDH}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T = 12.86 \times \Delta A$$

4、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟消耗 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_1 \div T = 6430.9 \times \Delta A$$

ε---NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ L} / \text{mol} / \text{cm}$;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.01 mL;

V2---反应体系总体积, $2 \times 10^{-4} \text{ L}$;

T---反应时间, 1min;

500---细胞或细菌总数, 500 万。

W---样本质量, g;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。