



NADP-苹果酸脱氢酶(NADP-MDH)试剂盒（叶绿体、微生物）

可见分光光度法

货号: R45035-48S

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。

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60mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂×2支	-20℃保存	临用前甩几下或离心使试剂落到底部, 每支加1.8mL蒸馏水溶解, 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融, 三天内用完。
试剂二	液体35mL×1瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂×2支	-20℃保存	临用前甩几下或离心使试剂落到底部, 每支加1.8mL蒸馏水溶解, 三天内用完。

所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿(光径1cm)、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、蒸馏水。

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℃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℃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紫外分光光度计预热30min 以上, 调节波长至340nm, 蒸馏水调零。

②测定前将溶好的试剂一在25℃水浴锅中孵育10min 以上。

③在 1mL 石英比色皿(光径1cm) 中依次加入:

试剂名称(μ L)	测定管
样本	40
试剂一	60
试剂二	640
试剂三	60
混匀, 30℃下立即于340nm下读取A1, 1min后读取A2, $\Delta A = A1 - A2$ 。	

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1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T$$
$$= 3215.4 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算:

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

$$\text{NADP-MDH}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T$$
$$= 3215.4 \times \Delta A \div W$$

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1nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_1 \div V) \div T$$
$$= 6.43 \times \Delta A$$

4、按液体体积计算:

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

$$\text{NADP-MDH}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \times V_2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_1 \div T$$
$$= 3215.4 \times \Delta A$$

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

d ---光径, 1cm;

V --- 加入提取液体积, 1mL;

V_1 ---加入样本体积, 0.04mL;

V_2 ---反应体系总体积, $8 \times 10^{-4} \text{L}$;

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。