

CheKine™ NADP-苹果酸脱氢酶 (NADP-MDH) 活性检测试剂盒 (微量法)

货号: KTB3020

规格: 48 T/48 S

96 T/96 S

批号: 见产品标签

	适用样本: 动物组织、植物组织、细胞、细菌、血清 (浆)
	保质期: -20℃, 避光保存 6 个月

01 背景与原理

苹果酸脱氢酶 (Malate Dehydrogenase, MDH) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中, 线粒体中 MDH 是三羧酸循环 (TCA) 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。

本试剂盒检测原理是 NADP-MDH 催化 NADPH 还原草酰乙酸生成苹果酸, 导致 340 nm 处光吸收下降。

02 包装清单

试剂盒组分	规格		储存要求
	48 T	96 T	
Reagent I	60 mL	60 mL×2	4℃
Reagent II	12 mL	24 mL	4℃
Reagent III	Powder×1 vial	Powder×1 vial	-20℃, 避光保存

*请在实验前检查各组分的量。

*各组分在规格基础上额外提供 10% 的量用于进行标准曲线制作或预实验。

03 自备仪器与试剂

自备资源类型	资源名称	备注
仪器	酶标仪	能测 340 nm 处的吸光度
耗材	96 孔酶标板	UV 板
试剂	PBS	样本清洗用
其他	匀浆器（组织样本）、低温离心机、水浴锅、制冰机、 可调节式移液枪及枪头	检测量较大时合理使用多通道移液器有 助于提高实验效率

04 注意事项

- 正式检测前，建议选择 2-3 个预期差异较大的样本进行预实验。
- 对于组织样本及细胞样本等，可通过测定蛋白浓度来进行样本间结果均一化。推荐使用亚科因货号：KTD3001 的蛋白质定量试剂盒（BCA 法）。
- 本试剂盒兼容分光光度计检测，请按照分光光度计检测要求按比例调节检测试剂配制量。如有疑问，可咨询 本司技术人员（400-6800-830）。
- 生化检测试剂普遍具有刺激性、生物毒性等，为了您的安全和健康，请在实验全程做好生物安全防护，穿戴 实验服、口罩、手套、头套等安全护具，在通风橱、生物安全柜中进行实验。
- 本产品仅供科学研究使用，不适用于临床诊断。

05 实验流程

05-1 试剂准备

试剂名称	试剂准备	注意事项
Reagent I	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Reagent II	即用型；使用前平衡到室温	4℃保存
Working Solution	临用前配置；将 Reagent II 全部加入 Reagent III 中，充分 溶解待用	未用完的试剂分装后-20℃避光保存一 周，禁止反复冻融

05-2 样本制备

注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃保存 1 个月。测定过程中，样本和所有试剂在冰上放置，以免变性和失活。

- 组织：称取约 0.1 g 样本，加入 1 mL Reagent I，冰浴匀浆，8000 g，4℃离心 10 min，取上清，置冰上待测。
- 细胞或细菌：收集 5×10⁶ 个细胞或细菌，用预冷的 PBS 清洗细胞或细菌，800 g 离心 2 min，弃上清。加入 1 mL Reagent I 进行冰浴超声破碎。超声波破碎 5 min（功率 20%或 200 W，超声 3 s，间隔 7 s，重复 30 次），4℃，8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。
- 血清（浆）样本：直接检测。

05-3 实验步骤

1. 酶标仪准备：预热 30 min 以上，调节波长到 340 nm。
2. Working Solution 于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）孵育 10 min。
3. 检测体系配制：空白管只需做 1-2 次。在 96 孔 UV 板中按照如下方式操作：

试剂	空白孔 (μL)	测定孔 (μL)
样本	0	5
Reagent I	5	0
Working Solution	195	195

4. 吸光度检测：立即混匀，测定 340 nm 处吸光值。记录第 20 s 和 1 min 20 s 时吸光值，分别记录为 A_1 和 A_2 。测定孔记为 $A_{测}$ ，空白孔记为 $A_{空}$ 。

06 结果计算

06-1 自动计算

为帮助您更轻松、准确地完成相关计算，我们特在官网提供了“在线计算器小工具”。您无需手动计算，只需在网页上输入数值，即可快速获得可靠结果。访问方式：请扫描右侧二维码或访问官网[\[https://www.abbkine.cn\]](https://www.abbkine.cn) > 进入“技术中心”> 查找“在线计算器”工具。



06-2 手动计算

以下为您提供的推导过程计算公式和简洁计算公式，两者完全相等。

1. 数据处理

计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ ， $\Delta\Delta A_{测} = \Delta A_{测} - \Delta A_{空}$

2. 样本 NADP-MDH 含量计算

● 按样本质量计算

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。

$$\text{NADP-MDH (U/g)} = [\Delta\Delta A_{测} \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \div V_{Reagent I} \times V_{样本}) \div T = 12861.74 \times \Delta\Delta A_{测} \div W$$

● 按细胞或细菌数量计算

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

$$\text{NADP-MDH (U/10}^4\text{)} = [\Delta\Delta A_{测} \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{样本} \div V_{Reagent I} \times N) \div T = 12861.74 \times \Delta\Delta A_{测} \div N$$

● 按血清（浆）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。

$$\text{NADP-MDH (nmol/min/mL)} = [\Delta\Delta A_{测} \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{样本} \div T = 12861.74 \times \Delta\Delta A_{测}$$

● 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。

$$\text{NADP-MDH (U/mg prot)} = [\Delta\Delta A_{测} \times V_{反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{样本} \times C_{pr}) \div T = 12861.74 \times \Delta\Delta A_{测} \div C_{pr}$$

$V_{反总}$ ：反应体系总体积，0.2 mL = 2×10^{-4} L； $V_{Reagent I}$ ：加入 Reagent I 体积，1 mL； $V_{样本}$ ：加入样本体积，0.005 mL； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：96 孔 UV 板直径，0.5 cm；Cpr：蛋白浓度 (mg/mL)；T：反应时间，1 min；W：样本质量，g；N：细胞或细菌数量，以 10^4 为单位（例如细胞数量为 5×10^6 ，N=500）； 10^9 ：单位换算系数，1 mol = 10^9 nmol。

07 结果展示

示例-1: 取 0.1 g 小鼠脑, 按照测定步骤操作, 用 96 孔 UV 板进行检测。测得 $\Delta\Delta A_{测} = \Delta A_{测} - \Delta A_{空} = (0.639 - 0.622) - (0.657 - 0.657) = 0.017$ 。按样本质量计算得: $NADP-MDH (U/g) = 12861.74 \times \Delta\Delta A_{测} \div W = 2186.50 U/g$ 。

08 FAQ

- 检测得到的样本 $\Delta\Delta A_{测}$ 过高或者过低怎么办?
如果 $\Delta\Delta A_{测}$ 小于 0.005, 可适当增大样本量, 如果 $\Delta\Delta A_{测}$ 大于 0.5, 样本可用 Reagent I 进一步稀释, 减少提取用样本量, 再重新进行测定。因通过单位时间内吸光值的变化计算酶活, 不推荐同时测多个样本。

09 相关产品

货号	试剂盒名称
KTB3021	CheKine™ NAD-苹果酸脱氢酶 (NAD-MDH) 活性检测试剂盒 (微量法)
KTB3030	CheKine™ 乙醇脱氢酶 (ADH) 活性检测试剂盒 (微量法)

CheKine™ NADP-苹果酸脱氢酶（NADP-MDH）含量检测流程示意图

(Abbking 货号：KTB3020)

