

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号: E-BC-K562-M

产品规格: 48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器: 酶标仪(440-460 nm)

Elabscience® NADP-苹果酸脱氢酶(NADP-MDH)

比色法测试盒

NADP-Malate Dehydrogenase (NADP-MDH)

Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话: 400-999-2100

邮箱: biochemical@elabscience.cn

网址: www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测动物组织、血清(浆)和细胞等样本中 NADP-苹果酸脱氢酶(NADP-MDH)的活力。

检测原理

苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH)广泛存在于动物, 植物, 细菌等各种生物体中, 是生物糖代谢三羧酸循环的关键酶之一, 能催化苹果酸与草酰乙酸之间的可逆转换。MDH 在细胞的多种生理活动中起着重要的作用, 包括线粒体的能量代谢以及植物的活性氧代谢等。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-苹果酸脱氢酶催化苹果酸与 NADP⁺转化成草酰乙酸与 NADPH, NADPH 在电子耦合剂的作用下使 WST-8 显橙黄色, 通过测定 450 nm 下吸光值变化可测得苹果酸脱氢酶活性。

本试剂盒检测组织或细胞样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extracting Solution)	60 mL×1 瓶	60 mL×2 瓶	-20℃ 保存 3 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 (Buffer Solution A)	15 mL×1 瓶	30 mL×1 瓶	-20℃ 保存 3 个月
试剂三 (Reagent 3)	底物 A (Substrate A)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 3 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 B (Substrate B)	粉剂×1 瓶	粉剂×2 瓶	-20℃ 避光 保存 3 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 (Chromogenic Agent)	3 mL×1 瓶	6 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 3 个月
试剂六 (Reagent 6)	标准品 (Standard)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 3 个月

	96 孔酶标板	1 板	
	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(440-460 nm，最佳检测波长 450 nm)，恒温箱(37 ℃)

试剂准备

① 检测前，试剂平衡至室温。

② 试剂三的溶解：

取一支试剂三加入1 mL双蒸水溶解，溶解后的试剂三建议分装避光保存，-20 ℃可保存5天，禁止反复冻融。

③ 试剂三工作液的配制：

使用前按照溶解后的试剂三和试剂二体积比=1: 15配制工作液，按需配制，配好的试剂三工作液在1天内使用有效。

④ 试剂四工作液的配制：

使用前取一瓶试剂四用5 mL双蒸水溶解，2-8 ℃可避光保存5天。

⑤ 反应工作液的配制：

按试剂三工作液：试剂四工作液体积比为7: 2混匀，按需配制，配好的工作液置于冰上待用，1 h内使用有效。

⑥ 500 μmol/L标准品溶液的配制：

使用前取一支试剂六加入1.6 mL试剂一充分溶解，未用完部分-20 ℃分装避光可保存5天，禁止反复冻融。

⑦ 不同浓度标准品的稀释:

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	100	150	200	300	400	450	500
500 $\mu\text{mol/L}$ 标准品(μL)	0	40	60	80	120	160	180	200
试剂一(μL)	200	160	140	120	80	40	20	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本: 直接测定。

组织样本: 组织样本使用试剂一匀浆处理, 离心后取上清, 一部分上清用于蛋白浓度测定。

细胞样本: 取 1×10^6 细胞加入 200 μL 试剂一匀浆处理, 离心后取上清, 一部分上清用于蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前, 需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验, 根据预实验的结果, 结合本试剂盒的线性范围: 0.63-50.0 U/L, 请参考下表稀释(仅供参考):

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠肾组织	3-10	10%大鼠心组织	1-5
10%小鼠肝组织	1-10	10%小鼠肺组织	3-10
10%小鼠肾组织	3-10	10%绿萝叶组织	不稀释
小鼠血清	不稀释	大鼠血清	不稀释
人血清	不稀释	大鼠血浆	不稀释
Ht29 细胞	不稀释	Molt-40 细胞	不稀释

注: 样本稀释液为试剂一。

实验关键点

反应工作液加入体系时注意避免气泡产生, 影响测定结果。

操作步骤

- ① 标准孔：取 20 μL 不同浓度的标准品溶液加入相应的酶标孔中。
测定孔：取 20 μL 待测样本加入测定孔中。
- ② 向步骤①中各孔依次加入 180 μL 反应工作液。
- ③ 向步骤②中各孔依次加入 40 μL 试剂五。
- ④ 振板 3 s，室温避光静置 2 min，酶标仪 450 nm 下检测各测定孔初始 OD 值 A_1 。
- ⑤ 37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育反应 10 min，酶标仪于 450 nm 波长检测各孔 OD 值 A_2 ，计算测定孔变化 OD 值 ΔA ($\Delta A = A_2 - A_1$)，标准曲线拟合取标准孔 OD 值 A_2 进行计算。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度的标准品溶液(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
反应工作液(μL)	180	180
试剂五(μL)	40	40
振板 3 s，室温避光静置 2 min，酶标仪 450 nm 波长检测各测定孔初始 OD 值 A_1 。		
37 $^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育反应 10 min，酶标仪于 450 nm 波长检测各孔 OD 值 A_2 ，计算测定孔变化 OD 值 ΔA ($\Delta A = A_2 - A_1$)，标准曲线拟合取标准孔 A_2 值进行计算。		

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

组织和细胞样本中 NADP-MDH 活力计算公式:

定义: 37 °C 条件下, 每克组织或细胞蛋白每分钟水解苹果酸的过程还原 NADP⁺生成 1 μmol NADPH 所需要的 MDH 酶量为一个活力单位。

$$\text{NADP-MDH 活性} \frac{(\text{U/gprot})}{=} (\Delta A_{450} - b) \div a \div T \div C_{\text{pr}} \times f$$

血清(浆)样本中 NADP-MDH 活力计算公式:

定义: 37 °C 条件下, 每升血清(浆)每分钟水解苹果酸的过程还原 NADP⁺生成 1 μmol NADPH 所需要的 MDH 酶量为一个活力单位。

$$\text{NADP-MDH 活性} \frac{(\text{U/L})}{=} (\Delta A_{450} - b) \div a \div T \times f$$

注解:

y: 标准孔 OD 值-空白孔 OD 值(标准品浓度为 0 时 OD 值); 标准曲线计算时只需要使用 A₂ 值

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA₄₅₀: 测定孔 A₂ 值-测定孔 A₁ 值

T: 孵育反应时间, 10 min

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr}: 组织/细胞样本蛋白浓度: gprot/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

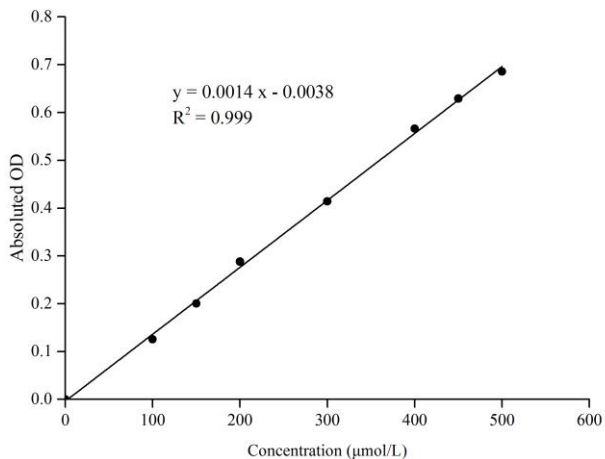
检测范围	0.63–50.0 U/L	平均批间差	6.4 %
灵敏度	0.63 U/L	平均批内差	1.0 %
平均回收率	103 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量20 μL ，按照操作步骤进行实验，各点OD值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	100	150	200	300	400	450	500
OD 值	0.060	0.189	0.263	0.35	0.482	0.64	0.689	0.757
	0.062	0.184	0.26	0.348	0.468	0.614	0.691	0.736
平均 OD 值	0.061	0.187	0.262	0.349	0.475	0.627	0.690	0.747
绝对 OD 值	0.000	0.126	0.201	0.288	0.414	0.566	0.629	0.686

②制标准曲线，如下图所示：



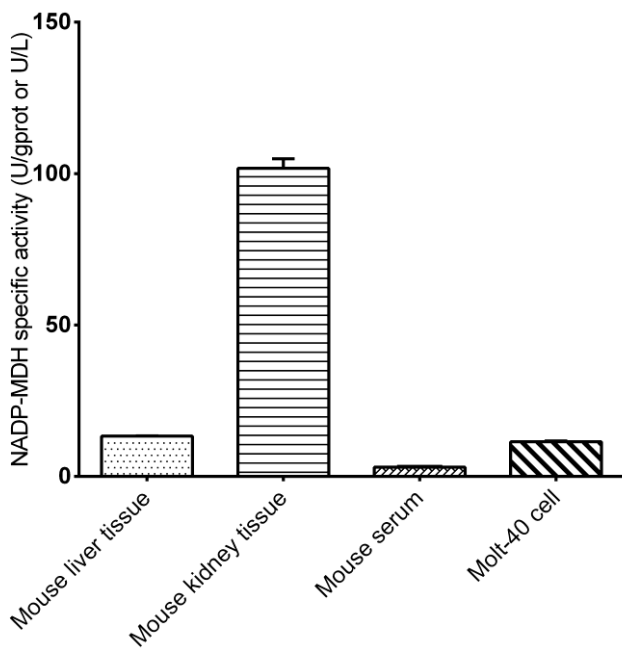
附录2 实例分析

例如检测小鼠肝组织(数据仅供参考):

取稀释7倍的10%小鼠肝组织匀浆上清液20 μL ,按操作表操作,结果如下:
标准曲线: $y = 0.0014x - 0.0038$, 测定初始OD值 A_1 为0.131, 反应10 min后测定OD值 A_2 为0.389, 10%小鼠肝组织匀浆蛋白浓度为9.83 gprot/L计算结果为:

$$\text{NADP-MDH 活力} = (0.389 - 0.131 + 0.0038) \div 0.0014 \div 10 \times 7 \div 9.83 = 13.32 \text{ U/gprot} \\ (\text{U/gprot})$$

按照说明书操作,测定小鼠肝组织(蛋白浓度为9.83 gprot/L,加样量为20 μL)、小鼠肾组织(10%组织匀浆蛋白浓度为4.20 gprot/L,加样量为20 μL)、小鼠血清(加样量为20 μL)和Molt-40细胞(1×10^6 个细胞匀浆蛋白浓度为0.557 gprot,加样量为20 μL)中NADP-MDH活力(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差较大	反应体系有气泡	消除气泡或重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Tseng S.Ja. An acid degradable, lactate oxidizing nanoparticle formulation for non-small cell lung cancer virotherapy[J]. *Nano Today*. IF:18.962
2. Salman T M, Iyanda M A, Alli-Oluwafuyi A M, et al. Telfairia occidentalis stimulates hepatic glycolysis and pyruvate production via insulin-dependent and insulin-independent mechanisms[J]. *Metabolism Open*, 2021, 10(1-10):100092. IF:8.694
3. Wang H, Huang Q, Zhang Z, et al. Transient post-operative overexpression of CXCR2 on monocytes of traumatic brain injury patients drives monocyte chemotaxis toward cerebrospinal fluid and enhances monocyte-mediated immunogenic cell death of neurons in vitro[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2022. IF:7.573
4. Carafa V, Russo R, Della Torre L, et al. The Pan-Sirtuin Inhibitor MC2494 Regulates Mitochondrial Function in a Leukemia Cell Line[J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10: 820. IF:4.848
5. Sun J, Leng P, Li X, et al. Salvianolic acid A promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes through regulation of the AMPK-PGC1 α signalling pathway. *Adipocyte*. 2022;11 (1):562-571. IF:3.553
6. Xu X, Cui Y, Li C, et al. SETD3 Downregulation Mediates PTEN Upregulation-Induced Ischemic Neuronal Death Through Suppression of Actin Polymerization and Mitochondrial Function. *Mol Neurobiol*. 2021; 58 (10):4906-4920. IF:3.464
7. Gao S, Li N, Chen R, et al. Bushen Huoxue Formula Modulates Autophagic Flux and Inhibits Apoptosis to Protect Nucleus Pulposus Cells by Restoring the AMPK/SIRT1 Pathway. *Biomed Res Int*. 2022; 2022:8929448. IF:3.047
8. Cheng F, Yu J, Zhang X, et al. CircSEC31A Promotes the Malignant Progression of Non-Small Cell Lung Cancer Through Regulating SEC31A Expression via Sponging miR-376a[J]. *Cancer Management and Research*, 2020, Volume 12:11527-11539. IF:2.886
9. Soebagjo H D, Fatmariyanti S, Paulus Sugianto N, et al. Detection of the Calcium and ATP Role in Apoptosis of Retinoblastoma Culture Cells through Caspase-3 Expression[J]. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2019, 12(03): 1307-1314.
10. Al-Ziyadi A G, Al-Shammari A M, Hamzah M I, et al. Newcastle disease virus suppress glycolysis pathway and induce breast cancer cells death[J]. *VirusDisease*, 2020: 1-8.

