

**NAD-苹果酸脱氢酶(NAD-MDH)活性检测试剂盒 (分光光度计法)**  
(本试剂盒仅供科研使用)

### 产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0219	NAD-苹果酸脱氢酶(NAD-MDH)活性检测试剂盒	50 管/48 样

### 产品内容

名称	规格	储存条件
提取液	液体 50mL ×1 瓶	4°C
试剂一	液体 40mL ×1 瓶	4°C
试剂二	粉剂×2 支: 临用前加入 360μL 双蒸水, 用不完的试剂仍-20°C保存。	-20°C
试剂三	粉剂×2 支: 临用前加入 327μL 双蒸水, 用不完的试剂仍-20°C保存。	-20°C

### 一、产品说明

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, 细菌中通常只含有 NAD-MDH, 在真核细胞中, NAD-MDH 分布于细胞质和线粒体中。

NAD-MDH 催化 NADH 还原草酰乙酸生成苹果酸, 导致 340nm 处光吸收下降。

### 二、自备材料

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

### 三、样本准备:

- 1、组织样本: 称取约 0.05g 组织, 加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆; 8000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 2、细菌、细胞样品: 细菌或培养细胞: 收集细菌或细胞到离心管内, 弃上清, 按照每 200 万细菌或细胞加入 400μL 提取液, 超声波破碎细菌或细胞 (功率 20%, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次), 8000g 4°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 3、血清 (浆) 样品: 直接检测。

### 四、操作步骤

**正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。**

- 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、试剂一预热 15min。
- 3、操作表

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	
蒸馏水		20
试剂一	760	760
试剂二	10	10
试剂三	10	10

将上述试剂按顺序加入 1 mL 石英比色皿中, 充分吸打混匀后立即在 340 nm 波长下记录初始吸光度 A1 和反应 1min 后的吸光度 A2, 尽量保持反应温度为 37°C。计算  $\Delta A = A1 - A2$ 。记录  $\Delta A$  测定、 $\Delta A$  空白。

## 五、NAD-MDH 酶活的计算

### 1、按照组织样本蛋白浓度计算:

单位的定义: 每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NAD-MDH (U/mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样本} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 6430 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

### 2、按照组织样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NAD-MDH (U/g 鲜重)} &= (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (W \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样本}) \div T \\ &= 6430 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W \end{aligned}$$

### 3、按照细菌/细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NAD-MDH (U/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (500 \times V \text{ 样本}) \div T \\ &= 13 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \end{aligned}$$

### 4、按照血清/血浆体积计算:

单位的定义: 每 mL 血清(浆)在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NAD-MDH (U/mL)} &= (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样本} \div T \\ &= 6430 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \end{aligned}$$

V 反总: 反应总体积, 0.8mL; V 样本: 加入样本体积, 0.02mL;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ mL/nmol/cm}$ ; d: 比色皿光径, 1cm; T: 反应时间, 1min; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; 500: 细菌或细胞密度,  $10^4/\text{mL}$

## 六、注意事项

- 1、粗酶液的提取必须在 0°C-4°C 中操做完成, 以防止酶变性失活。
- 2、实验时, 试剂二、试剂三和样本在冰上放置, 以免变性和失活。
- 3、当初始读值小于 0.7 或者  $\Delta A$  大于 0.5 时建议稀释后测量。
- 4、空白管测 1-2 管即可。