

# NAD-苹果酸脱氢酶 (NAD-MDH) 活性检测试剂盒

## (紫外分光光度法)

产品货号: BA1230

产品规格: 50管/48样

### 产品简介:

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。

**注意: 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

### 产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体50mL×1瓶	4℃
试剂一	液体40mL×1瓶	4℃
试剂二	粉剂×2支	-20℃
试剂三	粉剂×2支	-20℃

溶液的配制:

1. 试剂二: 临用前加入360 $\mu$ L双蒸水, 用不完的试剂仍-20℃保存;
2. 试剂三: 临用前加入327 $\mu$ L双蒸水, 用不完的试剂仍-20℃保存。

### 需自备的仪器和用品:

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

### 操作步骤:

#### 一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

细菌或培养细胞: 收集细菌或细胞到离心管内, 离心弃上清, 按照每200万细菌或细胞加入400 $\mu$ L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℃离心10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 称取约0.05g组织, 加入1mL提取液进行冰浴匀浆; 8000g 4℃离心10min, 取上清, 置冰上待测。

血清 (浆) 样本: 直接检测。

#### 二、测定步骤:

1. 紫外分光光度计提前预热30min, 调节波长至340nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂一37℃预热15min。
3. 样本测定:

试剂名称 ( $\mu$ L)	测定管	空白管
样本	20	-
蒸馏水	-	20
试剂一	760	760
试剂二	10	10



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

试剂三	10	10
-----	----	----

将上述试剂按顺序加入1mL石英比色皿中，充分吸打混匀后立即在340nm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℃。计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。记录 $\Delta A$ 测定、 $\Delta A$ 空白。（空白管测1-2管即可）

### 三、NAD-MDH活力单位的计算

#### 1. 血清（浆）NAD-MDH活力的计算

单位的定义：每毫升血清（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。

$$\text{NAD-MDH (U/mL)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样本}} \div T = 6431 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

#### 2. 组织中NAD-MDH活力的计算

（1）按样本蛋白浓度计算：

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。

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样本}} \times \text{Cpr}) \div T = 6431 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{Cpr}$$

（2）按样本质量计算：

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。

$$\text{NAD-MDH (U/g 质量)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 6431 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

#### 3. 细菌或培养细胞中NAD-MDH活力的计算

（1）按样本蛋白浓度计算：

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。

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样本}} \times \text{Cpr}) \div T = 6431 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{Cpr}$$

（2）按细菌或细胞密度计算：

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。

$$\text{NAD-MDH (U/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样本}}) \div T = 13 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

V反总：反应总体积，0.8mL；V样本：加入样本体积，0.02mL；V提取：提取液体积，1mL； $\epsilon$ ：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，500万/mL；W：样本质量，g。

### 注意事项：

1. 粗酶液的提取必须在0℃-4℃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. 建议一人加样一人比色。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com