

NAD-苹果酸脱氢酶（NAD-MDH）活性检测试剂盒（微量法）

产品货号：BA1231

产品规格：100管/96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100mL×1瓶	4℃
试剂一	液体20mL×1瓶	4℃
试剂二	粉剂×1支	-20℃
试剂三	粉剂×1支	-20℃

溶液的配制：

1. 试剂二：临用前加入360μL双蒸水，用不完的试剂仍-20℃保存；
2. 试剂三：临用前加入327μL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/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板（UV板）、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℃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/酶标仪提前预热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（μL）	测定管	空白管
样本	5	-
蒸馏水	-	5
试剂一	190	190
试剂二	2.5	2.5
试剂三	2.5	2.5

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿/96孔UV板中，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 ΔA 测定、 ΔA 空白。（空白管测1-2管即可）

三、NAD-MDH活力单位的计算

A：使用微量石英比色皿检测的计算公式如下



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

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。

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

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。

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

(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。

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

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。

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

(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。

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

V反应：反应总体积，0.2mL；V样本：加入样本体积，0.005mL；V提取：提取液体积，1mL；ε：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。

B：使用96孔UV板检测的计算公式如下

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。

$$\text{NAD-MDH (U/mL)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div V_{\text{样本}} \div T = 10718 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

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。

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样本}} \times \text{Cpr}) \div T = 10718 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{NAD-MDH (U/g质量)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 10718 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

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。

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样本}} \times \text{Cpr}) \div T = 10718 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{NAD-MDH (U/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div (500 \times V_{\text{样本}}) \div T = 21 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

V反应：反应总体积，0.2mL；V样本：加入样本体积，0.005mL；V提取：提取液体积，1mL；ε：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^{-3} \text{ mL/nmol/cm}$ ；d：96孔UV板光径，0.6cm；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°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. 使用光径为1cm的微量石英比色皿时当初始读值小于0.7或者ΔA大于0.5时建议稀释后测量。使用96孔UV板时当初始读值小于0.4或者ΔA大于0.3时建议稀释后测量。
4. 建议一人加样一人比色。因时间监测范围小，不推荐用96孔UV板同时测多个样本。



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

QQ：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com