



NAD-苹果酸脱氢酶检测试剂盒

NAD-MDH Assay Kit

紫外分光光度法

产品编号: AK374U

产品规格: 50T/48S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES374	60 mL×1 瓶	4℃保存
AK374-A	40 mL×1 瓶	4℃保存
AK374-B	粉剂×2 支	-20℃保存; 临用前加入 300μL 蒸馏水, 充分溶解待用; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。
AK374-C	粉剂×2 支	-20℃保存; 临用前加入 300μL 蒸馏水, 充分溶解待用; 用不完的试剂分装后-20℃保存, 禁止反复冻融。

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

意义: 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。

原理: 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。

自备用品:

紫外分光光度计、研钵/匀浆器、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。

样本准备:

1. 细菌、细胞或组织样品的制备:

细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): ES374 体积 (mL) 为 1000~5000: 1 的比例 (建议 2000 万细菌或细胞加入 1mL ES374), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 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: 按照组织质量 (g): ES374 体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL ES374), 进行冰浴匀浆; 8000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

- 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 测定前将 AK374-B 在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 10min 以上。
- 操作表 (在 1 mL 石英比色皿中加入下列试剂):

试剂名称	测定管 (μL)
样本	20
AK374-A	760
AK374-B	10

AK374-C	10
混匀后立即记录 340nm 处 20s 时的吸光值 A1 和 1min20s 后的吸光值 A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$	

注意：若 A1-A2 大于 0.5，需将样本用 ES374 稀释，使 A1-A2 小于 0.5，可提高检测灵敏度；计算公式中乘以相应稀释倍数。

NAD-MDH 活性计算：

1. 血清（浆）NAD-MDH 活力的计算：

单位定义：每毫升血清（浆）每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 6430 \times \Delta A$$

2. 组织、细菌或细胞中 NAD-MDH 活力的计算：

（1）按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 6430 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

（2）按样本鲜重计算：

单位定义：每 g 组织每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6430 \times \Delta A \div W$$

（3）按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3.215 \times \Delta A$$

注：V 反总：反应体系总体积， 8×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol /cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.02mL；V 样总：加入提取液（ES374）体积，1 mL；T：反应时间，1 min；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；2000：细胞或细菌总数，2000 万。