



NAD-苹果酸脱氢酶检测试剂盒

NAD-MDH Assay Kit

微量法

产品编号: AK374M

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES374	100 mL×1 瓶	4℃保存;
AK374-A	20 mL×1 瓶	4℃保存;
AK374-B	粉剂×1 瓶	-20℃保存

※ 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/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) 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:

1. 分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

2. 检测工作液的配制: 用时在 AK374-B 中加入 19mL AK374-A 和 0.5mL 蒸馏水, 充分混匀待用; 用不完的试剂分装后 -20℃ 保存, 禁止反复冻融。

3. 测定前将检测工作液在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 10min 以上。

4. 操作表:

试剂名称	测定管 (μL)
样本	5
检测工作液	195
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:

a. 微量比色皿测定:

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。

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

(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: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d : 比色皿光径, 1cm;

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.005mL; $V_{\text{样总}}$: 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。

b. 用 96 孔板测定:

1. 血清(浆) NAD-MDH 活力的计算:

单位的定义: 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。

$$\text{NAD-MDH (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 12860 \times \Delta A$$

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:

单位的定义: 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。

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 12860 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算:

单位的定义: 每 g 组织中每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 12860 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 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。

$$\text{NAD-MDH (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6.43 \times \Delta A$$

注: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol / cm; d : 96 孔板光径, 0.5cm;

$V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.005 mL; $V_{\text{样总}}$: 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。