



## 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:**

- 分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 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。
- 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。
- 操作表：

试剂名称	测定管 ( $\mu\text{L}$ )
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  $\Delta\text{A}=\text{A1}-\text{A2}$ 。

**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 活力计算:

### a. 用微量比色皿测定:

#### 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。

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

##### (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。

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

##### (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。

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

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

V 样：加入样本体积，0.005mL；V 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。

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

##### (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。

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

##### (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。

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

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

V 样：加入样本体积，0.005 mL；V 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。