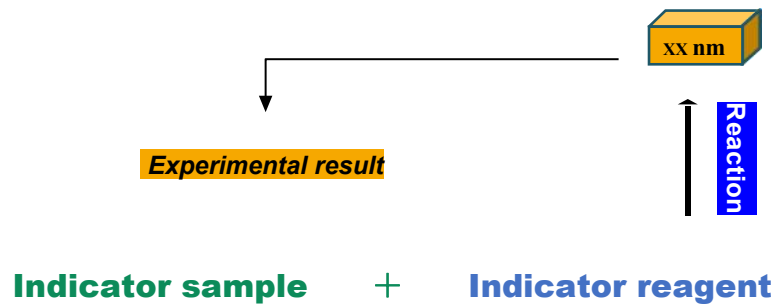


上海茁彩生物科技有限公司  
Shanghai zcibio technology Co.,Ltd.



生化检测原理示意图

## NAD-苹果酸脱氢酶（NAD-MDH）检测试剂盒说明书

### 紫外分光光度法

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

产品内容：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 50mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	-
试剂二	粉剂×2 支	-20℃保存	临用前加入 360 μL 双蒸水，用不完的试剂仍-20℃保存
试剂三	粉剂×2 支	-20℃保存	临用前加入 327 μL 双蒸水，用不完的试剂仍-20℃保存

产品说明：

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。

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、1 mL 石英比色皿和蒸馏水。

操作步骤：

#### 一、样品测定的准备：

##### 1、细菌、细胞样品的制备：

细菌或培养细胞：收集细菌或细胞到离心管内，弃上清，按照每 200 万细菌或细胞加入 400 μL 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。

2、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。

3、血清（浆）样品：直接检测。

## 二、测定步骤和加样表：

紫外分光光度计提前预热 30min，调节波长至 340nm，蒸馏水调零，试剂一 37℃预热 15min。

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
样本	20	-
蒸馏水	-	20
试剂一	760	760
试剂二	10	10
试剂三	10	10

将上述试剂按顺序加入 1 mL 石英比色皿中，充分吸打混匀后即在 340 nm 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。

## 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。

$$\text{NAD-MDH (U/mL)} = (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div V \text{ 样本} \div T = 6430 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白})$$

### 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。

$$\begin{aligned} \text{NAD-MDH (U/mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样本} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 6430 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

#### ② 按样本鲜重计算：

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。

$$\begin{aligned} \text{NAD-MDH (U/g 鲜重)} &= (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (W \div V \text{ 提取} \times V \text{ 样本}) \div T \\ &= 6430 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div W \end{aligned}$$

### 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。

$$\begin{aligned} \text{NAD-MDH (U/mg prot)} &= (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (V \text{ 样本} \times \\ &\quad C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 6430 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

#### 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。

$$\begin{aligned} \text{NAD-MDH (U/10}^4 \text{ cell)} &= (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \div (\epsilon \times d) \times V \text{ 反总} \div (500 \times V \text{ 样本}) \div T \\ &= 13 \times (\Delta A \text{ 测定} - \Delta A \text{ 空白}) \end{aligned}$$

V 反总：反应总体积，0.8mL；V 样本：加入样本体积，0.02mL； $\epsilon$ ：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， $10^4/\text{mL}$

### 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、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。
- 5、空白管测 1-2 管即可。