

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0310

Size: 100T/96S

NAD-苹果酸脱氢酶 (NAD-MDH) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

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 NAD-MDH, 在真核细胞中, NAD-MDH 分布于细胞质和线粒体中。

二、测定原理:

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。

三、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) 和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置:

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
试剂一	提取液 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 20mL×1 瓶	在 4℃保存	
试剂三	粉剂×1 瓶	-20℃保存	

五、操作步骤：

● 样本测定的准备：

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)：试剂一体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一)，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)：试剂一体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一)，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、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。

2、检测工作液的配制：用时在试剂三中加入 19mL 试剂二和 0.5mL 蒸馏水，充分混匀待用；现配现用；

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、在微量石英比色皿或 96 孔板 (UV 板) 中加入 5 μ L 样本和 195 μ L 工作液，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，需将样本用提取液稀释，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。

六、NAD-MDH 活力单位的计算：

● 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、血清（浆）NAD-MDH 活力的计算

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

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

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。

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

2) 按样本鲜重计算：

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

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

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 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NAD-MDH (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 12.86 \times \Delta A \end{aligned}$$

$V_{\text{反总}}$ ：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； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； T ：反应时间，1min； W ：样本质量，g； C_{pr} ：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：细胞或细菌总数，500 万。

● 用 96 孔板 (UV 板) 测定的计算公式如下

1、血清 (浆) NAD-MDH 活力的计算

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

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

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 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

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。

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

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 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NAD-MDH (nmol/min/10}^4\text{cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ T &= 25.72 \times \Delta A \end{aligned}$$

V 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 (UV 板) 光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.005 mL; V 样总: 加入提取液体积, 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;
500: 细胞或细菌总数, 500 万。