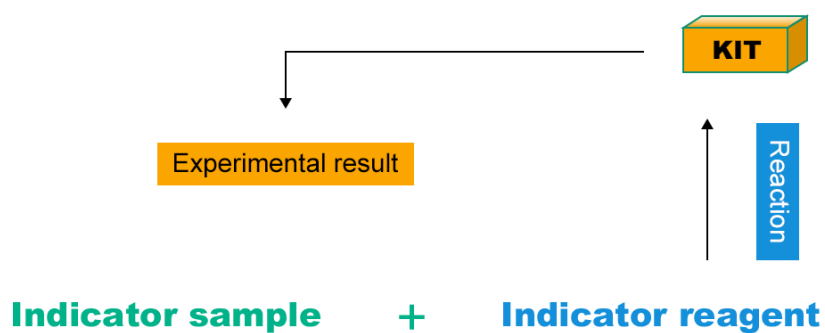


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0578

Size: 50T/48S

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

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, 细菌中通常只含有 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、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。

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
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

五、操作步骤：

1. 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。

2. 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 1mL 石英比色皿中，充分吸打混匀后立即在 340nm 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 ΔA 测定、 ΔA 空白。

六、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。

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

（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。

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

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

七、注意事项：

1. 粗酶液的提取必须在 $0^{\circ}\text{C} - 4^{\circ}\text{C}$ 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 ΔA 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。