

## NAD-苹果酸脱氢酶 (NAD-MDH) 试剂盒说明书

分光光度法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 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。

### 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。

### 组成:

产品名称	CE005-50T/48S	Storage
试剂一: 提取液	60ml	4°C
试剂二: 液体	50ml	4°C
试剂三: 粉剂	2 瓶	-20°C
试剂四: 粉剂	2 瓶	-20°C
说明书	一份	

试剂三、粉剂×2 支, -20°C 保存; 临用前加入 300μl 蒸馏水, 充分溶解待用; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融。

试剂四、粉剂×2 支, -20°C 保存; 临用前加入 300μl 蒸馏水, 充分溶解待用; 用不完的试剂分装后-20°C 保存, 禁止反复冻融。

### 自备仪器和用品:

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。

### 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 1000~5000：1 的比例（建议 2000 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、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 2、将试剂二在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 10min 以上。
- 3、操作表：

试剂名称（ $\mu$ l）	测定孔
样本	20
试剂二	760
试剂三	10
试剂四	10

将上述试剂按顺序加入 1 ml 石英比色皿中，混匀后立即在 340 nm 波长下记录初始吸光度 A1 和反应 1min 后的吸光度 A2，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。

### 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）每分钟消耗 1 nmol 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。

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

(2) 按样本鲜重计算：

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

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

(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。

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

V 反总：反应体系总体积， $8 \times 10^{-4}$  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，0.02ml；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；2000：细胞或细菌总数，2000 万。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利

