

NAD-苹果酸脱氢酶 (NAD-MDH) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1231

产品规格: 100管/96样

产品简介:

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。

注意: 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品组成:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体100mL×1瓶	4°C
试剂一	液体20mL×1瓶	4°C
试剂二	粉剂×1支	-20°C
试剂三	粉剂×1支	-20°C

溶液的配制:

1. 试剂二: 临用前加入360 μ L双蒸水, 用不完的试剂仍-20°C保存;
2. 试剂三: 临用前加入327 μ L双蒸水, 用不完的试剂仍-20°C保存。

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)、研钵/匀浆器、蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

细菌或培养细胞: 收集细菌或细胞到离心管内, 离心弃上清, 按照每200万细菌或细胞加入400 μ L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°C离心10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 称取约0.05g组织, 加入1mL提取液进行冰浴匀浆; 8000g 4°C离心10min, 取上清, 置冰上待测。

血清 (浆) 样本: 直接检测。

二、测定步骤:

1. 紫外分光光度计/酶标仪提前预热30min, 调节波长至340nm, 蒸馏水调零。
2. 试剂一37°C预热15min。
3. 样本测定:

试剂名称 (μ L)	测定管	空白管
样本	5	-
蒸馏水	-	5
试剂一	190	190



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

试剂二	2.5	2.5
试剂三	2.5	2.5

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿/96孔UV板中，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°C。计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。记录 ΔA 测定、 ΔA 空白。（空白管测1-2管即可）

三、NAD-MDH活力单位的计算

A：使用微量石英比色皿检测的计算公式如下

1. 血清（浆）NAD-MDH活力的计算

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

$$\text{NAD-MDH (U/mL)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div V_{\text{样本}} \div T = 6431 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

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。

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 6431 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

（2）按样本质量计算：

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。

$$\text{NAD-MDH (U/g 质量)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 6431 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

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。

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 6431 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

（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。

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

V反应：反应总体积，0.2mL；V样本：加入样本体积，0.005mL；V提取：提取液体积，1mL； 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，500万/mL；W：样本质量，g。

B：使用96孔UV板检测的计算公式如下

1. 血清（浆）NAD-MDH活力的计算

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

$$\text{NAD-MDH (U/mL)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div V_{\text{样本}} \div T = 10718 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

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。

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 10718 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

（2）按样本质量计算：

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。

$$\text{NAD-MDH (U/g 质量)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 10718 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

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。

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 10718 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

（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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司

Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

$\text{NAD-MDH (U/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div (500 \times V_{\text{样本}}) \div T = 21 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$

V反应：反应总体积，0.2mL；V样本：加入样本体积，0.005mL；V提取：提取液体积，1mL； ϵ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ mL/nmol/cm}$ ；d：96孔UV板光径，0.6cm；T：反应时间，1min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；500：细菌或细胞密度，500万/mL，W：样本质量，g。

注意事项：

1. 粗酶液的提取必须在0°C-4°C中操作完成，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. 使用光径为1cm的微量石英比色皿时当初始读值小于0.7或者 ΔA 大于0.5时建议稀释后测量。使用96孔UV板时当初始读值小于0.4或者 ΔA 大于0.3时建议稀释后测量。
4. 建议一人加样一人比色。因时间监测范围小，不推荐用96孔UV板同时测多个样本。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>