

NAD-苹果酸脱氢酶(NAD-MDH)活性检测试剂盒 (微量法)
(本试剂盒仅供科研使用)

产品包装

产品编号	产品名称	产品规格
YFX0220	NAD-苹果酸脱氢酶(NAD-MDH)活性检测试剂盒	100 管/96 样

产品内容

名称	规格	储存条件
试剂一	液体 100mL ×1 瓶	4°C
试剂二	液体 20mL ×1 瓶	4°C
试剂三	粉剂×1 瓶	-20°C

一、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。

二、自备材料

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 孔板和蒸馏水。

三、样本准备:

- 1、组织: 准确称取 0.1g 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。
- 2、细菌或细胞: 收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 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); 8000 4°C 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。
- 3、血清或血浆: 直接检测。

四、操作步骤

正式测定前, 必需取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

- 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°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 水浴 10min 以上。
- 4、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 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 $\Delta A = A1 - A2$ 。

五、NAD-MDH 活力的计算

用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、按照组织样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 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、按照组织样本鲜重计算

酶活定义: 每 g 组织每分钟消耗 1nmol 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、按照细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 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。

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

4、按照血/血浆体积计算

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

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

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: 比色皿光径, 1cm; 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。

用96孔板测定的计算公式如下

1、按照组织样本蛋白浓度计算

酶活定义: 每 mg 组织蛋白每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

2、按照组织样本鲜重计算

酶活定义: 每 g 组织中每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

3、按照细菌/细胞密度计算

酶活定义: 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。

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

4、按照血清/血浆体积计算

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

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

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。