



NAD-苹果酸脱氢酶(NAD-MDH) 试剂盒说明书

(货号: PB1026W96 微量法 96 样)

有效期: 3 个月

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。

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 孔板和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

试剂一、提取液 100 mL×1 瓶, 在 4℃ 保存;

试剂二、液体 20 mL×1 瓶, 在 4℃ 保存;

试剂三、粉剂×1 瓶, -20℃ 保存;

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: 收集细菌或细胞到离心管内, 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), 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 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 双蒸水, 充分混匀待用。

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 孔板中加入 5 μL 样本和 195 μL 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, 需将酶液用提取液稀释, 使 A1-A2 小于 0.5, 可提高检测灵敏度。

NAD-MDH 活力单位的计算:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、血清 (浆) NADP-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 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

2、组织、细菌或细胞中 NADP-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 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 6431 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 6431 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟消耗 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 12.86 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADPH 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: 样品质量, g; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1、血清(浆) NADP-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 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 12862 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中 NADP-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 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 12862 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(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 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 12862 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟消耗 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-MDH (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 25.72 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 mol/L/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: 样品质量, g; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; 500: 细胞或细菌总数, 500 万。