

NAD-苹果酸脱氢酶 (NAD-MDH) 活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号: AC10230

规格: 50T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 50 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×2 支	-20°C保存
试剂三	粉剂×2 支	-20°C保存

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。

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。

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。

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、1mL石英比色皿、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 (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°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

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。

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

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。

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

（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。

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

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。

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

（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；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。

注意事项：

- 1、粗酶液的提取必须在 0°C- 4°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。

实验实例:

- 1、取 0.05g 大鼠肝脏加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清后按照测定步骤操作, 测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=0.917-0.293=0.624, ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.789-0.784=0.005, 按样本质量计算酶活得:
NAD-MDH (U/g 质量) =6431 \times (ΔA 测定- ΔA 空白) \div W=6431 \times 0.619 \div 0.05=79616 U/g 质量。
- 2、取 0.05g 柳树叶加入 1mL 提取液进行匀浆研磨, 取上清后按照测定步骤操作, 测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=0.812-0.741=0.071, ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.789-0.784=0.005, 按样本质量计算酶活:
NAD-MDH (U/g 质量) =6431 \times (ΔA 测定- ΔA 空白) \div W=6431 \times 0.066 \div 0.05=8489 U/g 质量。
- 3、取 20 μ L 小鼠血浆直接按照测定步骤操作, 测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=0.855-0.789=0.066, ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.789-0.784=0.005, 按血清/血浆体积计算酶活得:
NAD-MDH (U/mL) =6431 \times (ΔA 测定- ΔA 空白)=6431 \times 0.061=392 U/mL。

参考文献:

- [1] Yao Y X, Li M, Zhai H, et al. Isolation and characterization of an apple cytosolic malate dehydrogenase gene reveal its function in malate synthesis[J]. Journal of plant physiology, 2011, 168(5): 474-480.