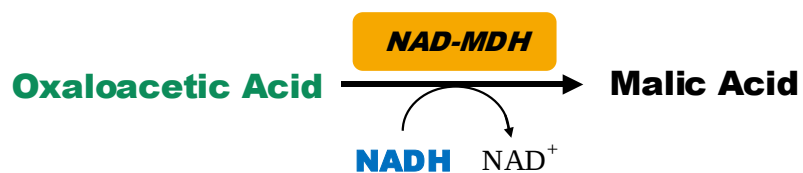




NAD-苹果酸脱氢酶 (NAD-MDH) 活性检测试剂盒
NAD-Malate Dehydrogenase (NAD-MDH) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



NAD-苹果酸脱氢酶 (NAD-MDH) 活性检测试剂盒

NAD-Malate Dehydrogenase (NAD-MDH) Activity Assay Kit

一、产品描述

苹果酸脱氢酶 (MDH) 广泛存在于动植物、微生物和培养细胞中,能够催化苹果酸与草酰乙酸间的可逆转换,在细胞线粒体能量代谢、苹果酸-天冬氨酸穿梭系统、活性氧代谢等多种生理活动中扮演着重要的角色。根据不同的辅酶特异性,苹果酸脱氢酶分为 NAD-依赖型和 NADP-依赖型,细菌中通常只含有 NAD-MDH,真核细胞中 NADP-MDH 多分布于细胞质和线粒体中。

NAD-苹果酸脱氢酶能够催化 NADH 还原草酰乙酸生成苹果酸, NADH 在 340 nm 处具有特征吸收峰,通过吸光值的变化即可表征 NAD-苹果酸脱氢酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液	液体 120 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂一	液体 25 mL×1 瓶	4°C保存	-
试剂二	粉剂×1 支	-20°C避光保存	使用前加入 650 μ L 蒸馏水充分溶解 (可分装后-20°C保存,避免反复冻融)
试剂三	粉剂×1 支	-20°C避光保存	使用前加入 650 μ L 蒸馏水充分溶解 (可分装后-20°C保存,避免反复冻融)

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂:紫外分光光度计/酶标仪、微量石英比色皿(光径 10 mm)/酶标仪、研钵/匀浆器、可调式移液器/多道移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1.粗酶液的制备(可根据预实验结果适当调整样品量及比例)

①组织:按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1:(5-10)的比例(建议称取 0.1 g 组织,加入 1 mL 提取液)处理样品,冰浴匀浆,4°C 10000 g 离心 10 min,取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞:离心收集细菌或细胞至离心管内,按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为 (500-1000):1 的比例(建议 500 万细菌或细胞加入 1 mL 提取液)处理样品,冰浴超声破碎(功率 20%或 200 W,超声 3 s,间隔 10 s,重复 30 次);4°C 10000 g 离心 10 min,取上清置于冰上待测。

③血清(浆)、培养液等液体样品:直接检测或适当稀释后再进行检测。

2. 测定步骤

- ①紫外分光光度计或酶标仪预热 30 min 以上，调节波长至 340 nm，蒸馏水调零。
- ②试验前将试剂一 37°C 预热 20 min。
- ③在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)	空白组 (μL)
粗酶液	5	-
蒸馏水	-	5
试剂一	185	185
试剂二	5	5
试剂三	5	5

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s 时（总时间）340 nm 处吸光值，记为 A1 测定和 A1 空白；②37°C 恒温准确反应 60 s，测定 70 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2 测定和 A2 空白；③计算 ΔA 测定=A1 测定-A2 测定， ΔA 空白=A1 空白-A2 空白， $\Delta A = \Delta A$ 测定- ΔA 空白。
注：空白组只需测定 1-2 次。

3. NAD-苹果酸脱氢酶（NAD-MDH）活性计算

3.1 使用 96 孔 UV 板测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

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

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}} \times T} = \frac{12861.74 \times \Delta A}{C_{\text{pr}}}$$

②按组织样本质量计算

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

$$\text{NAD-MDH (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{12861.74 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10⁴ 个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{12861.74 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_1 \times V_{\text{样}} \times T} = 12861.74 \times \Delta A$$

3.2 使用微量石英比色皿测定的计算公式

①按组织蛋白浓度计算

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

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times \text{Cpr} \times T} = \frac{6430.87 \times \Delta A}{\text{Cpr}}$$

②按组织样本质量计算

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

$$\text{NAD-MDH (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{6430.87 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{6430.87 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟消耗 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d_2 \times V_{\text{样}} \times T} = 6430.87 \times \Delta A$$

注释：V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.005 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；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_1 ：96 孔 UV 板光径，0.5 cm； d_2 ：微量石英比色皿光径，1 cm；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；细胞或细菌数量：以万计；T：反应时间，1 min； 10^9 单位换算系数：1 mol = 10^9 nmol。

四、注意事项

- ①粗酶液制备过程必须在冰上进行，保持低温环境以防止酶变性失活；
- ②试验过程中试剂二、试剂三和粗酶液需置于冰上放置，以防止变性和失活；
- ③若 $\Delta A > 0.5$ (96 孔 UV 板 > 0.3) 时，建议将粗酶液适当稀释后再进行测定，计算时相应修改；
- ④准确在 10 s 和 70 s 处完成测定，以确保实验结果的准确性和重复性；若使用 96 孔 UV 板进行测定，应使用多道移液器且分批进行检测，以确保组间反应时间一致；
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

