

## NAD-苹果酸脱氢酶 (NAD-MDH) 试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 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: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 ( $10^4$  个): 试剂一体积 (mL) 为 1000~2000: 1 的比例 (建议 2000 万细菌或细胞加入 1mL 试剂一), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 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: 按照组织质量 (g): 试剂一体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 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 蒸馏水, 充分混匀待用; 用不完的试剂分装后 -20℃ 保存, 禁止反复冻融。

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  $\mu$ L 样本和 195  $\mu$ 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  $\Delta A = A1 - A2$ 。

**注意:** 若 A1-A2 大于 0.5, 需将样本用提取液稀释, 使 A1-A2 小于 0.5, 可提高检测灵敏度。计算公式中乘以相应稀释倍数。

## 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）NAD-MDH 活力的计算

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

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

#### 2、组织、细菌或细胞中 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) 按样本鲜重计算：

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

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

##### (3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 3.215 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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；2000：细胞或细菌总数，2000 万。

### b.用 96 孔板测定的计算公式如下

#### 1、血清（浆）NAD-MDH 活力的计算

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

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

#### 2、组织、细菌或细胞中 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。

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

##### (2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：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) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (2000 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 6.43 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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；2000：细胞或细菌总数，2000 万。