

NAD-苹果酸脱氢酶（NAD-MDH）检测试剂盒（分光光度法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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。

试剂组成和配制：

试剂一：提取液 60 mL×1 瓶，在 4℃ 保存；

试剂二：液体 50 mL×1 瓶，在 4℃ 保存；

试剂三：粉剂×2 支，-20℃ 保存；临用前加入 300μL 蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

试剂四：粉剂×2 支，-20℃ 保存；临用前加入 300μL 蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃ 保存，禁止反复冻融。

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 1000~5000: 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、分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 2、将试剂二在 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 10min 以上。

3、操作表：

试剂名称 (μL)	测定孔
样本	20
试剂二	760
试剂三	10
试剂四	10

将上述试剂按顺序加入 1 mL 石英比色皿中，混匀后立即在 340 nm 波长下记录初始吸光度 A1 和反应 1min 后的吸光度 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：

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。

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

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。

$$\begin{aligned} \text{NAD-MDH (nmol/min/mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 6430 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(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。

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

(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。

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

V 反总：反应体系总体积， 8×10^{-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，0.02mL；

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。