

NAD-苹果酸脱氢酶 (NAD-MDH) 检测试剂盒 (微量法)

货号：PMK1002

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织、细胞、细菌、血清（浆）等液体样本

产品简介

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。本试剂盒提供了一种简单、方便、快速的 NAD-MDH 活性检测方法，其原理是 NADH 在 340nm 处有特征吸收峰，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。在 340nm 下测定 NADH 减少的速率可计算获得 NAD-MDH 的活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
试剂一	50mL	100mL	4℃ 保存
试剂二	10mL	20mL	4℃ 保存
试剂三	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20℃ 避光保存

自备耗材

酶标仪或分光光度计（能测 340nm 处的吸光度）
 96 孔 UV 板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头
 水浴锅、制冰机，低温离心机
 去离子水
 匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

试剂一：即用型；4℃ 保存。
 试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。
 工作液：临用前配制，对于 48T，在试剂三中加入 9.5mL 试剂二和 0.25mL 去离子水；对于 96T，在试剂三中加入 19mL 试剂二和 0.5mL 去离子水，充分混匀待用；未用完的试剂分装-20℃ 避光保存，避免反复冻融。

样本制备

动植物组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 试剂一冰浴匀浆，8,000g，4℃ 离心 10min，取上清液置冰上待测。
 细胞或细菌：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 试剂一，超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），8,000g，4℃ 离心 10min，取上清液置冰上待测。
 血清（浆）等液体样本：直接测定，根据预实验确定稀释倍数。
注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在-80℃ 保存 1 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

产品说明书

实验步骤

1. 酶标仪或分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 340nm。分光光度计去离子水调零。
2. 工作液于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 10min 以上。
3. 在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入 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 A_1 和 1min20s 后的吸光值 A_2 ，计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

注意：1. 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 ΔA 小于 0.001 可将反应时间延长到 2 分钟或 5 分钟，计算时调整公式中的时间；如果 ΔA 大于 0.5，可用试剂一稀释样品，计算时结果乘以稀释倍数。

2. 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）。
3. 因通过反应速率计算酶活，使用 96 孔 UV 板时请根据操作速度控制一次测定的样本数（通常一次测定 4-8 个样本），不推荐同时测多个样本。

结果计算

A. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 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 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

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。

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

3. 按液体体积计算：

单位的定义：每 mL 液体样本在反应体系中每分钟消耗 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

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

4. 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。

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

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积， 2×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 mol/L/cm； d ：96 孔板光径，0.5cm；

$V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.005mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入试剂一体积，1mL； T ：反应时间，1min； Cpr ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样品质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径 d :0.5cm 调整为 d :1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1000 NAD 激酶 (NADK) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1001 乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1003 NADP-苹果酸脱氢酶 (NADP-MDH) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1004 NADH 氧化酶 (NOX) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1013 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PDH) / 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶检测试剂盒 (微量法)

PMK1014 胞浆异柠檬酸脱氢酶 (ICDHc) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1015 NADP 苹果酸酶 (NADP-ME) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1016 NAD-苹果酸酶 (NAD-ME) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1114 线粒体苹果酸脱氢酶 (MDHm) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

