

## NAD-苹果酸脱氢酶（NAD-MDH）试剂盒说明书

（微板法 96 样）

### 一、产品简介：

苹果酸脱氢酶广泛存在于动植物、微生物和培养细胞中，依据需要的辅酶不同，可分为：NAD-MDH和NADP-MDH，前者主要存在于线粒体和胞质中，后者存在于某些微生物和植物叶绿体中；苹果酸脱氢酶与多条生理代谢途径密切相关：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。

NAD-MDH（EC 1.1.1.37）催化 NADH 还原草酰乙酸生成苹果酸，使 NADH 在 340nm 处光吸收下降，进而通过 340nm 处光吸收的下降速率计算得到 NAD-MDH 的酶活性大小。

### 二、试剂盒的组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂×2 支	-20℃保存	临用前甩几下或离心使试剂落到底部，每支加 0.9mL 蒸馏水溶解，用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融，三天内用完。
试剂二	液体 18mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂×2 支	-20℃保存	临用前甩几下或离心使试剂落到底部，每支加 0.9mL 蒸馏水溶解，三天内用完。

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、蒸馏水。

### 四、NAD-苹果酸脱氢酶（NAD-MDH）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

##### ① 组织样本：

称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例提取

##### ② 细菌/细胞样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液；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）；12000rpm 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。（或按照细菌或细胞数量（ $10^4$  个）：提取液体积（mL）为 1000~2000：1 的比例进行提取）

【注】：若增加样本量，可按细菌/细胞数量（ $10^4$  个）：提取液（mL）为 1000~5000：1 的比例进行提取

③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

#### 2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，设定温度 25℃。

② 测定前将溶好的试剂一在 25℃水浴锅中孵育 10min 以上。

③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
样本	10
试剂一	15
试剂二	160
试剂三	15
混匀, 30°C下立即于 340nm 下读取 A1, 1min 后读取 A2, $\Delta A=A1-A2$ 。	

- 【注】** 1. 若  $\Delta A$  在零附近, 可延长反应时间 T (如增至 10min) 读取 A2; 或加大样本量 V1 (如增至 30μL, 则试剂二相应减少)。改变后的反应时间 T 或 V1 需代入公式重新计算。
2. 若  $\Delta A$  大于 0.6 或 A2 的值小于 0.5, 需缩短反应时间 T (如减至 0.5min), 或减少样本量 V1 (如减至 5μL, 则试剂二相应增加), 则改变后的 T 和 V1 需代入公式重新计算。
3. 若起始值 A1 太大如超过 2 (颜色较深的植物叶片, 一般色素较高则起始值相对会偏高), 可减少 V1 (如减至 5μL, 则试剂二相应增加), 则改变后的 V1 代入公式重新计算。  
或向待测样本中加少许活性炭混匀静置 5min 后 12000rpm, 4°C 离心 10min, 上清液用于检测;
4. 若下降趋势不稳定, 可以每隔 10S 读取一次吸光值, 选取一段线性下降的时间段来参与计算, 相对应的 A 值也代入公式重新计算。

## 五、结果计算:

### 1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 每毫克组织蛋白每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times Cpr) \div T = 6430.9 \times \Delta A \div Cpr$$

### 2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 每克组织中每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 6430.9 \times \Delta A \div W$$

### 3、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 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。

$$\text{NAD-MDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 12.86 \times \Delta A$$

### 4、按液体体积计算:

酶活定义: 每毫升液体每分钟消耗 1 nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 6430.9 \times \Delta A$$

$\epsilon$ ---NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3 \text{ L/mol/cm}$ ;

d---96 孔板光径, 0.5cm;

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.01 mL;

V2---反应体系总体积,  $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ;

T---反应时间, 1min;

500---细胞或细菌总数, 500 万。

W---样本质量, g;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。