

NAD-苹果酸脱氢酶 (NAD-MDH) 试剂盒说明书

(货号: BN72081 分光法 48 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 60mL×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,再加 1.8mL 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 35mL×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,再加 1.8mL 蒸馏水溶解,三天内用完。

三、所需的仪器和用品:

紫外分光光度计、1mL 石英比色皿(光径 1cm)、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 紫外分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 340nm,蒸馏水调零。

② 测定前将溶好的试剂一在 25℃水浴锅中孵育 10min 以上。

③ 在 1mL 石英比色皿中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	40
试剂一	60
试剂二	640
试剂三	60
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 ΔA 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 80μL, 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 ΔA 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 10μL, 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 10μL, 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。

$$\text{NAD-MDH (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 3215.4 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{NAD-MDH (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V1 \div V) \div T = 3215.4 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{NAD-MDH (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V1 \div V) \div T = 6.43 \times \Delta A$$

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。

$$\text{NAD-MDH (nmol/min/mL)} = [\Delta A \times V2 \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V1 \div T = 3215.4 \times \Delta A$$

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

d---96 孔板光径, 1cm;

V---加入提取液体积, 1 mL;

V1---加入样本体积, 0.04mL;

V2---反应体系总体积, $8 \times 10^{-4} \text{ L}$;

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。