

NAD-苹果酸脱氢酶(NAD-MDH)试剂盒

- 【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(EC1.1.137)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。

【货号】 TMC020

【规格】 96T

【包装清单】

试剂名称	规格	保存条件	
提取液	液体100mL×1瓶	4℃	
试剂一	粉剂mg×2支	-20℃	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℃	
试剂三	粉剂mg×2支	-20℃	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。

【保存条件】 4℃保存，有效期一年。

【操作步骤】 1、样本制备：

①组织样本：

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

注：也可以按照组织质量(g):提取液体积(mL)为1:5~10的比例提取。

②细菌/真菌样本：

先收集细菌或细胞到离心管内，离心弃上清;取500万细菌或细胞加入1mL提取液;冰浴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, 取上清液, 置冰上待测。

注:也可按照细菌或细胞数量(10^4 个):提取液体积(mL)为1000~5000:1的比例进行提取。

③液体样本:直接检测, 若浑浊则离心后取上清检测。

2、上机检测:

①酶标仪预热30min以上, 设定温度至25℃, 调节波长到340nm。

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

3、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1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

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

②按样本鲜重计算:

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

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

ϵ ---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, 0.01mL;

$V2$ ---反应体系总体积, 2×10^{-4} ;

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。

- 【注意事项】**
- 1、本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
 - 2、为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
-