

NAD-苹果酸脱氢酶（NAD-MDH）活性检测试剂盒说明书

微量法

货号：BC1045

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 100 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	粉剂×1 支	-20℃保存

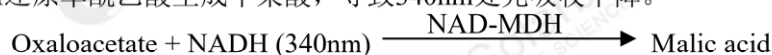
溶液的配制：

- 1、试剂二：临用前加入 360 μL 双蒸水，用不完的试剂仍-20℃保存；
- 2、试剂三：临用前加入 327 μL 双蒸水，用不完的试剂仍-20℃保存。

产品说明：

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。

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。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/ 96 孔板（UV 板）、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

细菌或培养细胞：收集细菌或细胞到离心管内，离心弃上清，按照每 200 万细菌或细胞加入 400μL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 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：称取约 0.05g 组织，加入 1mL 提取液进行冰浴匀浆；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

血清（浆）样本：直接检测。（若溶液有浑浊，则离心后测定）

二、测定步骤

1、紫外分光光度计/酶标仪提前预热30min，调节波长至340nm，紫外分光光度计蒸馏水调零。





2、试剂一37℃预热15min。

3、样本测定：

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
样本	5	-
蒸馏水	-	5
试剂一	190	190
试剂二	2.5	2.5
试剂三	2.5	2.5

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿/96孔UV板中，立即按下计时器，充分吸打混匀（10s）立即在340nm波长下记录第10s吸光度A1和反应1min10s后的吸光度A2，尽量保持反应温度为37℃。计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。记录 ΔA 测定、 ΔA 空白。（空白管只需测1-2次）

三、NAD-MDH活力单位的计算

A：使用微量石英比色皿检测的计算公式如下

1. 血清（浆）NAD-MDH活力的计算

单位的定义：每毫升血清（浆）在反应体系中每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (U/mL)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样本}} \div T = 6431 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

2. 组织中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。

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样本}} \times \text{Cpr}) \div T = 6431 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{Cpr}$$

（2）按样本质量计算：

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。

$$\text{NAD-MDH (U/g 质量)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T = 6431 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

3. 细菌或培养细胞中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。

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样本}} \times \text{Cpr}) \div T = 6431 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{Cpr}$$

（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。

$$\text{NAD-MDH (U/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样本}}) \div T = 13 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

V反总：反应总体积，0.2mL；V样本：加入样本体积，0.005mL；V提取：提取液体积，1mL； ϵ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3 \text{ mL/nmol/cm}$ ；d：微量石英比色皿光径，1cm；T：反应时间，1min；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；500：细菌或细胞密度，500万/mL；W：样本质量，g。

B：使用96孔UV板检测的计算公式如下

1. 血清（浆）NAD-MDH活力的计算

单位的定义：每毫升血清（浆）在反应体系中每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-MDH (U/mL)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样本}} \div T = 10718 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$



2. 组织中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。

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 10718 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本质量计算:

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。

$$\begin{aligned} \text{NAD-MDH (U/g 质量)} &= (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div (W \div V_{\text{提取}} \times V_{\text{样本}}) \div T \\ &= 10718 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \end{aligned}$$

3. 细菌或培养细胞中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。

$$\text{NAD-MDH (U/mg prot)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div (V_{\text{样本}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 10718 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

(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。

$$\text{NAD-MDH (U/10}^4 \text{ cell)} = (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反应}} \div (500 \times V_{\text{样本}}) \div T = 21 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

V反应: 反应总体积, 0.2mL; V样本: 加入样本体积, 0.005mL; V提取: 提取液体积, 1mL; ϵ : NADH摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{ mL/nmol/cm}$; d: 96孔UV板光径, 0.6cm; T: 反应时间, 1min; Cpr: 样本蛋白浓度, mg/mL; 500: 细菌或细胞密度, 500万/mL, W: 样本质量, g。

注意事项:

- 1、粗酶液的提取必须在 0°C-4°C 中操作完成, 以防止酶变性失活。
- 2、实验时, 试剂二、试剂三和样本在冰上放置, 以免变性和失活。
- 3、使用光径为 1cm 的微量石英比色皿时当初始读值小于 0.7 或者 ΔA 大于 0.5 时建议稀释后测量。使用 96 孔 UV 板时当初始读值小于 0.4 或者 ΔA 大于 0.3 时建议稀释后测量。
- 4、建议一人加样一人比色。因时间监测范围小, 不推荐用 96 孔 UV 板同时测多个样本。

实验实例:

- 1、取 0.05g 大鼠肝脏按照说明书步骤操作, 使用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=0.8484-0.3068=0.5416, ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.7628-0.7583=0.0045, 按样本质量计算酶活得:
 $\text{NAD-MDH (U/g 质量)} = 6431 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W = 6431 \times 0.5371 \div 0.05 = 69082 \text{ U/g 质量}。$
- 2、取 0.05g 柳树叶按照说明书测定步骤操作, 使用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=0.7796-0.6917=0.0879, ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.7628-0.7583=0.0045, 按样本质量计算酶活得:
 $\text{NAD-MDH (U/g 质量)} = 6431 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W = 6431 \times 0.0834 \div 0.05 = 10727 \text{ U/g 质量}。$
- 3、取 5 μL 血浆直接按照测定步骤操作, 使用微量石英比色皿测得计算 ΔA 测定管=A1 测定-A2 测定=0.8194-0.7959=0.0235, ΔA 空白管=A1 空白-A2 空白=0.7628-0.7583=0.0045, 按血清/血浆体积计算酶活得:
 $\text{NAD-MDH (U/mL)} = 6431 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) = 6431 \times 0.019 = 122 \text{ U/mL}。$

相关发表文献:





[1] Zhou Y, Liu X, Huang C, Lin D. Lactate Activates AMPK Remodeling of the Cellular Metabolic Profile and Promotes the Proliferation and Differentiation of C2C12 Myoblasts. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 13;23(22):13996. doi: 10.3390/ijms232213996. PMID: 36430479; PMCID: PMC9694550.

[2] Yang Q, Cai D, Chen W, Chen H, Luo W. Combined metabolic analyses for the biosynthesis pathway of l-threonine in *Escherichia coli*. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 Sep 9; 10:1010931. doi: 10.3389/fbioe.2022.1010931.

[3] Cao M, Cheng Q, Cai B, Chen Y, Wei Y, Qi D, Li Y, Yan L, Li X, Long W, Liu Q, Xie J, Wang W. Antifungal Mechanism of Metabolites from Newly Isolated *Streptomyces* sp. Y1-14 against Banana Fusarium Wilt Disease Using Metabolomics. *J Fungi (Basel).* 2022 Dec 9;8(12):1291. doi: 10.3390/jof8121291. PMID: 36547623; PMCID: PMC9784640.

[4] Wang Z, Wang X, Sheng X, Zhao L, Qian J, Zhang J, Wang J. Unraveling the Antibacterial Mechanism of Plasma-Activated Lactic Acid against *Pseudomonas ludensis* by Untargeted Metabolomics. *Foods.* 2023 Apr 10;12(8):1605. doi: 10.3390/foods12081605. PMID: 37107401; PMCID: PMC10137701.

参考文献:

[1] Yao Y X, Li M, Zhai H, et al. Isolation and characterization of an apple cytosolic malate dehydrogenase gene reveal its function in malate synthesis[J]. *Journal of plant physiology*, 2011, 168(5): 474-480.

相关系列产品:

- BC0310/BC0315 辅酶I NAD (H) 含量检测试剂盒
- BC1030/BC1035 NAD 激酶 (NADK) 活性检测试剂盒
- BC0630/BC0635 NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒
- BC1130/BC1135 NAD-苹果酸酶 (NAD-ME) 活性检测试剂盒

