

NAD-苹果酸脱氢酶（NAD-MDH）试剂盒说明书

（货号：BP10396W 微板法 96 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉剂 2 支	-20℃ 保存	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 每支加 0.9mL 蒸馏水溶解； 3. 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	每支： 1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使粉剂落入管底（可手动甩一甩）； 2. 每支加 0.9mL 蒸馏水溶解，三天内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

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、样本提取：

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 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

③ 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（10⁴ 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（10⁴ 个）：提取液（mL）为 1000~5000：1 的比例进行提取

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），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：

试剂组分 (μL)	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， $\Delta A = A1 - A2$ 。	

- 【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 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 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 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℃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。

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

2、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。

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

3、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。

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

4、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。

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

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