

(本试剂盒仅供体外研究使用，不用于临床诊断!)

产品货号：E-BC-K561-M

产品规格：48T(32 samples)/96T(80 samples)

检测仪器：酶标仪(440-460 nm)

Elabscience® NAD-苹果酸脱氢酶(NAD-MDH)

比色法测试盒

NAD-Malate Dehydrogenase (NAD-MDH)

Activity Assay Kit

使用前请仔细阅读说明书。如果有任何问题，请通过以下方式联系我们：

电话：400-999-2100

邮箱：biochemical@elabscience.cn

网址：www.elabscience.cn

具体保质期请见试剂盒外包装标签。请在保质期内使用试剂盒。

联系时请提供产品批号(见试剂盒标签)，以便我们更高效地为您服务。

用途

本试剂盒适用于检测血清(浆)、动物组织和细胞等样本中 NAD-苹果酸脱氢酶(NAD-MDH)的活力。

检测原理

苹果酸脱氢酶(Malate dehydrogenase, MDH)广泛存在于动物, 植物, 细菌等各种生物体中, 是生物糖代谢三羧酸循环的关键酶之一, 能催化苹果酸与草酰乙酸之间的可逆转换。根据不同的辅酶特异性, MDH 分为 NAD-依赖的 MDH 和 NADP-依赖的 MDH, NAD-MDH 通常存在于细菌及真核细胞的细胞质和线粒体中, NAD-MDH 苹果酸脱氢酶催化底物苹果酸与 NAD 转化成草酰乙酸与 NADH, NADH 在电子耦合剂的作用下使 WST-8 显橙黄色, 通过测定 450 nm 下吸光值变化值计算得到苹果酸脱氢酶活性。

本试剂盒检测组织或细胞样本时, 需测定总蛋白浓度, 推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

提供试剂和物品

编号	名称	规格 1 (Size 1)(48 T)	规格 2 (Size 2)(96 T)	保存方式 (Storage)
试剂一 (Reagent 1)	提取液 (Extracting Solution)	60 mL×1 瓶	60 mL×2 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂二 (Reagent 2)	缓冲液 A (Buffer Solution A)	10 mL×1 瓶	20 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂三 (Reagent 3)	缓冲液 B (Buffer Solution B)	5 mL×1 瓶	10 mL×1 瓶	-20℃ 保存 6 个月
试剂四 (Reagent 4)	底物 (Substrate)	粉剂×1 瓶	粉剂×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂五 (Reagent 5)	显色剂 (Chromogenic Agent)	3 mL×1 瓶	6 mL×1 瓶	-20℃ 避光 保存 6 个月
试剂六 (Reagent 6)	标准品 (Standard)	粉剂×1 支	粉剂×2 支	-20℃ 避光 保存 6 个月
	96 孔酶标板	48 孔×1 块	96 孔×1 块	无要求

	96 孔覆膜	2 张	
	样本位置标记表	1 张	

说明：试剂严格按上表中的保存条件保存，不同测试盒中的试剂不能混用。

对于体积较少的试剂，使用前请先离心，以免量取不到足够量的试剂。

所需自备物品

仪器：酶标仪(440-460 nm，最佳检测波长 450 nm)，恒温箱(37°C)

试剂准备

① 检测前，试剂平衡至室温。

② 试剂四工作液配制：

使用前取一瓶试剂四用5 mL双蒸水溶解，未用完部分-20°C分装避光可保存5天，禁止反复冻融。

③ 反应工作液的配制：

按试剂二：试剂三：试剂四工作液体积比为5: 2: 1混匀，现配现用，按需配制，配好的工作液置于冰上待用，1 h内使用有效。

④ 500 $\mu\text{mol/L}$ 标准品溶液的配制：

使用前取一支试剂六加入1.6 mL试剂一溶解，未用完部分-20°C分装避光可保存5天，禁止反复冻融。

⑤ 不同浓度标准品的稀释：

编号	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧
标准品浓度($\mu\text{mol/L}$)	0	100	150	200	300	350	400	500
500 $\mu\text{mol/L}$ 标准品(μL)	0	20	30	40	60	70	80	100
试剂一(μL)	100	80	70	60	40	30	20	0

样本准备

① 样本处理

血清(浆)样本：直接测定。

组织样本：组织样本使用试剂一匀浆处理，离心后取上清，一部分上清液进行蛋白浓度测定。

细胞样本：取 1×10^6 细胞加入 200 μ L 试剂一匀浆处理，离心后取上清，一部分上清液进行蛋白浓度测定。

② 样本的稀释

在正式检测前，需选择2-3个预期差异大的样本稀释成不同浓度进行预实验，根据预实验的结果，结合本试剂盒的线性范围：1.06-46.7 U/L，请参考下表稀释(仅供参考)：

样本	稀释倍数	样本	稀释倍数
10%大鼠肾组织	不稀释	10%大鼠脾组织	不稀释
10%大鼠肝组织	不稀释	10%大鼠心组织	不稀释
10%小鼠肝组织	不稀释	10%大鼠肺组织	不稀释
小鼠血清	不稀释	大鼠血清	不稀释
小鼠血浆	不稀释	大鼠血浆	不稀释
人血清	不稀释	狗血清	不稀释
Ht29 细胞	不稀释	Molt-40 细胞	不稀释

注：样本稀释液为试剂一。

实验关键点

反应工作液加入体系时注意避免气泡产生，以免影响测定结果。

操作步骤

- ① 标准孔：取 20 μL 不同浓度的标准品溶液加入相应的酶标孔中。
测定孔：取 20 μL 待测样本加入测定孔中。
- ② 向步骤①中各孔依次加入 160 μL 反应工作液。
- ③ 向步骤②中各孔依次加入 40 μL 试剂五。
- ④ 振板 3 s，室温避光静置 2 min，酶标仪 450 nm 下检测各测定孔初始 OD 值 A_1 。
- ⑤ 37°C 下避光孵育反应 10 min。酶标仪于 450 nm 波长检测各孔 OD 值 A_2 ，计算测定孔变化 OD 值 ΔA ($\Delta A = A_2 - A_1$)，标准曲线拟合取标准孔 OD 值 A_2 进行计算。

操作表

	标准孔	测定孔
不同浓度标准品(μL)	20	--
待测样本(μL)	--	20
反应工作液(μL)	160	160
试剂五(μL)	40	40
振板 3 s，室温避光静置 2 min，酶标仪 450 nm 波长检测各测定孔初始 OD 值 A_1 。		
37°C 下避光孵育反应 10 min。酶标仪于 450 nm 波长检测各孔 OD 值 A_2 ，计算测定孔变化 OD 值 ΔA ($\Delta A = A_2 - A_1$)，标准曲线取标准孔 A_2 值进行计算。		

本试剂盒检测组织或细胞样本时，需测定总蛋白浓度，推荐使用本公司 BCA 试剂盒(货号 E-BC-K318-M)进行测定。

结果计算

标准品拟合曲线: $y = ax + b$

组织和细胞样本中 NAD-MDH 活力计算公式:

定义: 37°C 条件下, 每克组织或细胞蛋白每分钟水解苹果酸的过程还原 NAD^+ 生成 1 μmol NADH 所需要的 MDH 酶量为一个活力单位。

$$\text{NAD-MDH 活性} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div T \div C_{\text{pr}} \times f \\ (\text{U/gprot})$$

血清(浆)样本中 NAD-MDH 活力计算公式:

定义: 37°C 条件下, 每升血清(浆)每分钟水解苹果酸的过程还原 NAD^+ 生成 1 μmol NADH 所需要的 MDH 酶量为一个活力单位。

$$\text{NAD-MDH 活性} = (\Delta A_{450} - b) \div a \div T \times f \\ (\text{U/L})$$

注解:

y: 标准孔 OD 值-空白孔 OD 值(标准品浓度为 0 时 OD 值); 标准曲线计算时只需要使用 A_2 值

x: 标准品的浓度

a: 标曲的斜率

b: 标曲的截距

ΔA_{450} : 测定孔 A_2 值-测定孔 A_1 值

T: 孵育反应时间, 10 min

f: 样本加入检测体系前的稀释倍数

C_{pr} : 组织/细胞样本蛋白浓度: gprot/L

附录1 关键数据

1. 技术参数

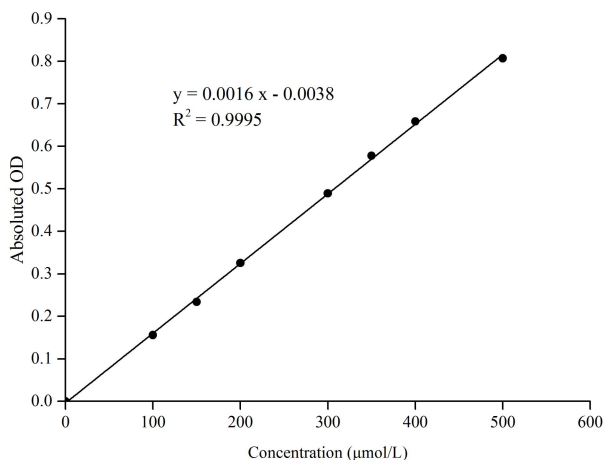
检测范围	1.06-46.7 U/L	平均批间差	8.4 %
灵敏度	1.06 U/L	平均批内差	3.0 %
平均回收率	96 %		

2. 标准曲线(数据仅供参考)

①不同浓度的标准品加样量20 μL ，按照操作步骤进行实验，各点OD值如下表所示：

标准品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0	100	150	200	300	350	400	500
OD 值	0.059	0.215	0.297	0.390	0.554	0.647	0.714	0.856
	0.059	0.215	0.289	0.379	0.543	0.627	0.721	0.876
平均 OD 值	0.059	0.215	0.293	0.385	0.549	0.637	0.718	0.866
绝对 OD 值	0.000	0.156	0.234	0.326	0.490	0.578	0.659	0.807

②制标准曲线，如下图所示：



附录2 实例分析

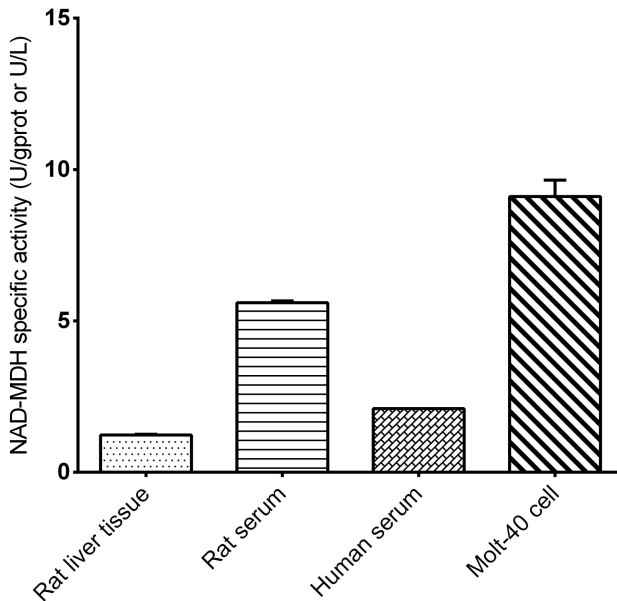
例如检测大鼠肝组织(数据仅供参考):

取10%大鼠肝组织匀浆上清液20 μL , 按操作表操作, 结果如下:

标准曲线: $y = 0.0016x - 0.0038$, 测定初始OD值 A_1 为0.701, 反应10 min后测定OD值 A_2 为0.52, 10%大鼠肝组织匀浆蛋白浓度为8.63 gprot/L计算结果为:

$$\text{NAD-MDH 活力 (U/gprot)} = (0.701 - 0.52 + 0.0038) \div 0.0016 \div 10 \div 8.63 = 1.33 \text{ U/gprot}$$

按照说明书操作, 测定大鼠肝组织(10%组织匀浆蛋白浓度为8.63 gprot/L, 加样量20 μL)、大鼠血清(加样量20 μL)、人血清(加样量20 μL)和Molt-40细胞(1×10^6 个细胞匀浆蛋白浓度为0.619 gprot, 加样量20 μL)中NAD-MDH活力(如下图):



附录3 问题答疑

问题	可能原因	建议解决方案
复孔差较大	反应体系有气泡	消除气泡或重新检测

声明

1. 试剂盒仅供研究使用，如将其用于临床诊断或任何其他用途，我公司将不对因此产生的问题负责，亦不承担任何法律责任。
2. 实验前请仔细阅读说明书并调整好仪器，严格按照说明书进行实验。
3. 实验中请穿着实验服并戴乳胶手套做好防护工作。
4. 试剂盒检测范围不等同于样本中待测物的浓度范围。如果样品中待测物浓度过高或过低，请对样本做适当的稀释或浓缩。
5. 若所检样本不在说明书所列样本类型之中，建议先做预实验验证其检测有效性。
6. 最终的实验结果与试剂的有效性、实验者的相关操作以及实验环境等因素密切相关。本公司只对试剂盒本身负责，不对因使用试剂盒所造成的样本消耗负责，使用前请充分考虑样本可能的使用量，预留充足的样本。

附录4 客户发表文献

1. Tseng S.Ja. An acid degradable, lactate oxidizing nanoparticle formulation for non-small cell lung cancer virotherapy[J]. Nano Today. IF:18.962
2. Salman T M, Iyanda M A, Alli-Oluwafuyi A M, et al. Telfairia occidentalis stimulates hepatic glycolysis and pyruvate production via insulin-dependent and insulin-independent mechanisms[J]. Metabolism Open, 2021, 10(1-10):100092. IF:8.694
3. Wang H, Huang Q, Zhang Z, et al. Transient post-operative overexpression of CXCR2 on monocytes of traumatic brain injury patients drives monocyte chemotaxis toward cerebrospinal fluid and enhances monocyte-mediated immunogenic cell death of neurons in vitro[J]. Journal of Neuroinflammation, 2022. IF:7.573
4. Carafa V, Russo R, Della Torre L, et al. The Pan-Sirtuin Inhibitor MC2494 Regulates Mitochondrial Function in a Leukemia Cell Line[J]. Frontiers in Oncology, 2020, 10: 820. IF:4.848
5. Sun J, Leng P, Li X, et al. Salvianolic acid A promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes through regulation of the AMPK-PGC1 α signalling pathway. Adipocyte. 2022;11 (1):562-571. IF:3.553
6. Xu X, Cui Y, Li C, et al. SETD3 Downregulation Mediates PTEN Upregulation-Induced Ischemic Neuronal Death Through Suppression of Actin Polymerization and Mitochondrial Function. Mol Neurobiol. 2021; 58 (10):4906-4920. IF:3.464
7. Gao S, Li N, Chen R, et al. Bushen Huoxue Formula Modulates Autophagic Flux and Inhibits Apoptosis to Protect Nucleus Pulposus Cells by Restoring the AMPK/SIRT1 Pathway. Biomed Res Int. 2022; 2022:8929448. IF:3.047
8. Cheng F, Yu J, Zhang X, et al. CircSEC31A Promotes the Malignant Progression of Non-Small Cell Lung Cancer Through Regulating SEC31A Expression via Sponging miR-376a[J]. Cancer Management and Research, 2020, Volume 12:11527-11539. IF:2.886
9. Soebagio H D, Fatmariyanti S, Paulus Sugianto N, et al. Detection of the Calcium and ATP Role in Apoptosis of Retinoblastoma Culture Cells through Caspase-3 Expression[J]. Research Journal of Pharmacy and Technology, 2019, 12(03): 1307-1314.
10. Al-Ziaydi A G, Al-Shammari A M, Hamzah M I, et al. Newcastle disease virus suppress glycolysis pathway and induce breast cancer cells death[J]. VirusDisease, 2020: 1-8.

