

## NAD-苹果酸酶 (Malic enzyme, NAD-ME) 试剂盒说明书

(货号: BN72078 微板法 96 样)

### 一、产品简介:

苹果酸酶是生物体内重要的酶之一,广泛存在于动物、植物、细菌体中。是苹果酸代谢的关键酶。近年来植物 ME 活性测定较多,已经成为抗氧化研究的热点。该酶发挥作用需要辅酶因子的参与,依据辅酶因子的不同,分为 NAD-ME(EC 1.1.1.38)和 NADP-ME(EC 1.1.1.40)。

ME 的主要功能是催化苹果酸氧化脱羧产生丙酮酸和  $\text{CO}_2$ , 以及伴随  $\text{NAD(P)}^+$  的还原反应, NADP-ME 催化  $\text{NAD}^+$  还原成 NADH, 本试剂盒通过检测 NADH 在 340nm 处的增加速率即可得出 NAD-ME 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 100mL×1 瓶 | 4℃保存   |                                  |
| 试剂一  | 粉剂 mg×1 支    | -20℃保存 | 使用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解。 |
| 试剂二  | 粉剂 mg×1 支    | 4℃保存   | 使用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解。 |
| 试剂三  | 粉剂 mg×1 支    | 4℃保存   | 使用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解。 |
| 试剂四  | 液体 20mL×1 瓶  | 4℃保存   |                                  |
| 试剂五  | 粉剂 mg×1 支    | 4℃保存   | 使用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加 1.1mL 蒸馏水溶解。 |

### 三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、蒸馏水。

### 四、NAD-苹果酸酶 (NAD-ME) 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】:按照组织质量(g):提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例。

##### ② 细菌/培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内,离心后弃上清;取约 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。

【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 液体样品: 直接检测。若浑浊,离心后取上清检测。

#### 2、上机检测:

##### ① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 340nm。

##### ② 所有试剂放在 25℃水浴 10min;

##### ③ 试剂二、三和四可按照操作表加样体系以 10:10:150 的比例混合,一次性取出 170μL。

##### ④ 在 96 孔板中依次加入:

| 试剂名称 (μL)                                                | 测定管 |
|----------------------------------------------------------|-----|
| 样本                                                       | 10  |
| 试剂一                                                      | 10  |
| 试剂二                                                      | 10  |
| 试剂三                                                      | 10  |
| 试剂四                                                      | 150 |
| 试剂五                                                      | 10  |
| 混匀，立即于 340nm 下读取 A1 值，室温 (25℃) 下，3min 后读取 A2 值。ΔA=A2-A1。 |     |

【注】若ΔA 过小，可以延长反应时间 T（如：10min 或更长），或增加样本上样量 V1（如增至 20μL，则试剂四相应减少），重新调整的 T 或 V1 需代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算：

### 1、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：25℃条件下，每毫克组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活单位。

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

$$= 2143.6 \times \Delta A \div Cpr$$

### 3、按样本鲜重计算：

酶活定义：25℃条件下，每克组织每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活单位。

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

$$= 2143.6 \times \Delta A \div W$$

### 4、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：25℃条件下，每 1 万个细菌/细胞每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$\text{NAD-ME}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \div V \times 500) \div T = 4.29 \times \Delta A$$

### 5、按照液体体积计算：

酶活定义：25℃条件下，每毫升液体每分钟生成 1nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$\text{NAD-ME}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 2143.6 \times \Delta A$$

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

V---加入提取液体积，1 mL；

V1---加入样本体积，0.01mL；

V2---反应总体积，200μL =  $2 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

T---反应时间，3min；

W---样本质量；

d---光径，0.5cm；

500---细菌或细胞总数，500 万；

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。