

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

(货号: BN72079 分光法 48 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 CO_2 , 以及伴随 NAD(P)^+ 的还原反应, NADP-ME 催化 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 50mL×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 1.2mL 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 1.2mL 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 1.2mL 蒸馏水溶解。
试剂四	液体 40mL×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 1.2mL 蒸馏水溶解。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、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 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

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 20:20:680 的比例混合, 一次性取出 720μL。

④ 在 1mL 玻璃比色皿中依次加入:

试剂名称 (μL)	测定管
样本	40
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	20
试剂四	680
试剂五	20
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 60μL，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。

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

$$= 1071.8 \times \Delta A \div Cpr$$

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。

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

$$= 1071.8 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{NAD-ME}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div (V1 \div V \times 500) \div T = 2.14 \times \Delta A$$

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。

$$\text{NAD-ME}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V2 \times 10^9] \div V1 \div T = 1071.8 \times \Delta A$$

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，0.04mL；

V2---反应总体积，800μL = $8 \times 10^{-4} \text{ L}$ ；

T---反应时间，3min；

W---样本质量；

d---光径，1cm；

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。