

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0322

Size: 100T/96S

NAD-苹果酸酶 (NAD-ME) 检测试剂盒说明书

微量法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

ME 广泛存在于微生物、培养细胞、动物和植物胞浆中,尤其在植物组织中活性较高。ME 催化苹果酸氧化脱羧的可逆反应,产生丙酮酸和 CO_2 , 以及伴随 NAD(P)⁺ 的还原反应,是苹果酸代谢的关键酶。ME 活性与生物合成和抗氧化密切相关。近年来植物 ME 活性测定较多,已经成为抗氧化研究的热点。根据辅酶专一性和对底物特异性的不同,可将 ME 分为 NAD-ME (EC1. 1. 1. 38) 和 NADP-ME (EC1. 1. 1. 40)。

二、测定原理:

NADP-ME 催化 NADP^+ 还原成 NADPH, 在 340nm 下测定 NADPH 增加速率。

三、需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、微量石英比色皿/96 孔板 (ZC-1036: UV 板)、匀浆器和蒸馏水

四、试剂的组成和配置：

种类	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 110mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 10mL 提取液充分溶解备用
试剂三	粉剂×1 支	4℃保存	用时每支加 1mL 双蒸水充分溶解备用
试剂四	粉剂×1 支	-20℃保存	用时每支加 500 μL 双蒸水充分溶解备用
工作液：在 7.5mL 试剂二中加入 1mL 试剂三和 0.5mL 试剂四，可以根据比例现用现配			

五、操作步骤：

● 粗酶液提取：

细菌、细胞或组织样品的制备：

细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，弃上清，按照每 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞（功率 20%，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 0.1g 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）样品：直接检测

● 测定步骤:

- 1、紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、将试剂一在 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种) 中保温 15min 左右。
- 3、操作表

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	200
工作液	90
样本	10

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿/96 孔 UV 板中混匀, 在 37°C (哺乳动物) 或 25°C (其它物种), 340nm 波长下记录初始吸光度 A1 和反应 1min 后的吸光度 A2, 计算 $\Delta A=A2-A1$ 。

六、注意事项:

- 1、若 $A2-A1$ 大于 0.5, 需将酶液用提取液稀释, 使 $A2-A1$ 小于 0.5, 可提高检测灵敏度。
- 2、实验时, 试剂三、试剂四和样本在冰上放置, 以免变性和失活。试剂一 37°C 或 25°C 水浴放置。
- 3、比色皿中反应液的温度必须保持 37°C 或 25°C, 取小烧杯一只装入一定量的 37°C 或 25°C 蒸馏水, 将此烧杯放入 37°C 或 25°C 水浴锅中。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。用 96 孔板 (UV 板) 做时尽量保持反应温度在 37°C 或 25°C。
- 4、最好两个人同时做此实验, 一个人比色, 一个人计时, 以保证实验结果的准确性。用 96 孔板 (UV 板) 做时尽量做到样本反应时间一致。
- 5、如果 $\Delta A < 0.01$, 可将反应时间延长 5 分钟或 10 分钟。

七、NADP-ME 活性计算：

● 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

1、组织中 NADP-ME 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生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 4823 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NADP-ME (U/g 鲜重)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 4823 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

2、细菌或细胞中 NADP-ME 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生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NADP-ME (U/mg prot)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 4823 \times \Delta A \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

(2) 按细菌或细胞数量计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{NADP-ME (U/10}^4 \text{ cell)} &= [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T \\ &= 9.65 \times \Delta A \end{aligned}$$

3、血清（浆）中 NADP-ME 活力的计算：

单位的定义：每 mL 血清在反应体系中每分钟生成 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 4823 \times \Delta A$$

$V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, 3×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L/mol/cm;
 d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.01mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1mL; T :
反应时间, 1min; C_{pr} : 样本蛋白质浓度, mg/mL; W : 样品质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

● 用96孔板（UV板）测定的计算公式：

将上述公式中的 d -96 孔板光径改为 0.8cm 进行计算。