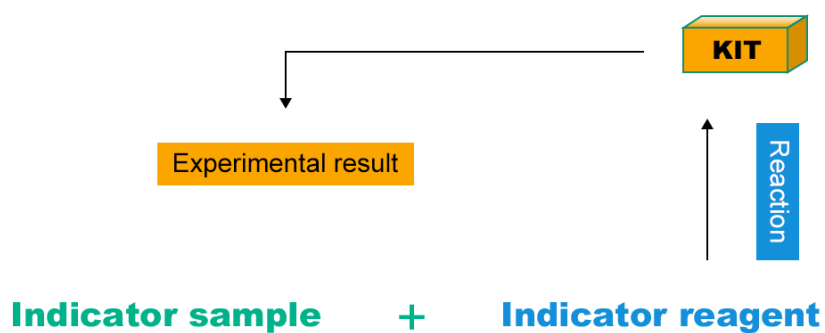


上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0593

Size: 50T/48S

NAD-苹果酸酶 (NAD-ME) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*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、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、1mL 石英比色皿、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 70mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂×1 瓶	4℃保存	临用前加入 20mL 提取液充分溶解备用
试剂三	粉剂×2 支	4℃保存	用时每支加 1mL 双蒸水充分溶解备用
试剂四	粉剂×2 支	-20℃保存	用时每支加 500 μL 双蒸水充分溶解备用
工作液: 在 15mL 试剂二中加入 2mL 试剂三和 1mL 试剂四,可以根据比例现用现配			

五、操作步骤:

1. 粗酶液提取:

细菌、细胞或组织样品的制备:

- (1) 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。
- (2) 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。
- (3) 血清(浆)样品: 直接检测。

2. 测定步骤:

- (1) 紫外分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- (2) 将试剂一在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (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	600
工作液	270
样本	30

将上述试剂按顺序加入 1mL 石英比色皿中, 混匀后在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (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 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

六、注意事项:

- 1、若 $A_2 - A_1$ 大于 0.5, 需将酶液用提取液稀释, 使 $A_2 - A_1$ 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℃ 或 25℃ 水浴放置。

3、比色皿中反应液的温度必须保持 37℃或 25℃，取小烧杯一只装入一定量的 37℃或 25℃蒸馏水，将此烧杯放入 37℃或 25℃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。

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。

5、如果 $\Delta A < 0.01$ ，可将反应时间延长到 5 分钟或 10 分钟。

七、NADP-ME 活性计算：

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 1nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

$$= 4823 \times \Delta A \div W$$

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 1nmol 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) 按细菌或细胞密度计算：

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。

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

3、血清中 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 1 nmol 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， 9×10^{-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，0.03 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； 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。