

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

(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 CO₂,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 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	粉剂 mg×1 支	-20°C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°C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°C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°C保存	
试剂五	粉剂 mg×1 支	4°C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°C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°C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 (10⁴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°C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°C) 下, 3min 后读取 A2 值。 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

【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°C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。

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

3、按样本鲜重计算:

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

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

4、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 25°C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。

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

5、按照液体体积计算:

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

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

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

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, $200\mu\text{L} = 2 \times 10^{-4}\text{L}$;

T---反应时间, 3min;

W---样本质量;

d---光径, 0.5cm;

500---细菌或细胞总数, 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。