

NAD-苹果酸酶 (NAD-ME) 活性检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

货号: AC10248

规格: 50T/48S

产品组成: 使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致, 有疑问请及时联系本公司工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 70 mL×1 瓶	4°C保存
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	4°C保存
试剂二	粉剂×1 瓶	4°C保存
试剂三	粉剂×2 支	4°C保存
试剂四	粉剂×2 支	-20°C保存

溶液的配制:

- 1、试剂二: 临用前加入 20 mL 提取液充分溶解备用;
- 2、试剂三: 临用前每支加 1 mL 双蒸水充分溶解备用;
- 3、试剂四: 用时每支加 500 μ L 双蒸水充分溶解备用;
- 4、工作液: 在 15 mL 试剂二中加入 2 mL 试剂三和 1 mL 试剂四, 可以根据比例现用现配。

产品说明:

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CO₂, 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)。

NAD-ME催化NAD⁺还原成NADH, 在340nm下测定NADH增加速率。

注意: 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

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、研钵/匀浆器、蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

1、细菌、细胞或组织样本的制备:

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°C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°C离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、血清 (浆) 样本: 直接检测。

二、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°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	600
工作液	270
样本	30

将上述试剂按顺序加入 1 mL 石英比色皿中，混匀后在 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种），340 nm 波长下记录初始吸光度 A1 和反应 5min 后的吸光度 A2，计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

三、NAD-ME 活性计算

1、组织中NAD-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 NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 965 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

（2）按样本质量计算：

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

$$\text{NAD-ME (U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 965 \times \Delta A \div W$$

2、细菌或细胞中NAD-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 NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 965 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

（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 NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 1.93 \times \Delta A$$

3、血清中NAD-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 NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 965 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， $9 \times 10^{-4}\text{L}$ ； ϵ ：NADH摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3\text{L/mol/cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.03mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，5min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500万； 10^9 ：单位换算系数， $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

注意事项：

- 1、若A2-A1大于0.5，需将样本用提取液稀释，使A2-A1小于0.5，可提高检测灵敏度。
- 2、实验时，样本在冰上放置，以免变性和失活。试剂一在37°C或25°C水浴放置。
- 3、在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入此烧杯中。
- 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、注意：如果 $\Delta A < 0.01$ ，可将反应时间延长到10分钟。

实验实例：

1、取 0.1g 肝加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清，按照测定步骤操作，测得计算 $\Delta A = A_2 - A_1 = 0.929 - 0.665 = 0.264$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{NAD-ME (U/g 质量)} = 965 \times \Delta A \div W = 965 \times 0.264 \div 0.1 = 2547.6 \text{ U/g 质量。}$$

参考文献：

[1] Spampinato C P, Colombo S L, Andreo C S. Interaction of analogues of substrate with NADP-malic enzyme from maize leaves[J]. Photosynthesis research, 1994, 39(1): 67-73.