

NAD-苹果酸酶(NAD-ME)检测试剂盒说明书

(货号: PB1183F48 分光法 48 样)

有效期: 3 个月

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)。

测定原理:

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

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 mL 石英比色皿和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

提取液: 60mL×1 瓶, 4℃ 保存。;

试剂一: 液体 40mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 液体 20mL×1 瓶, 4℃ 保存;

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 500μL 双蒸水充分溶解备用。

样本的前处理:

1、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。

2、血清(浆)样品: 直接检测。

测定操作表:

试剂名称(μL)	测定管
试剂一	600
试剂二	225
试剂三	30
试剂四	15
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℃(哺乳动物)或 25℃(其它物种),340 nm 波长下记录初始吸光度 A_1 和反应 1min 后的吸光度 A_2 ,计算 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

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、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。



3、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。

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 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/mg prot)} = \text{反应总体积 (900}\mu\text{L)} \div \text{样本体积 (30}\mu\text{L)} \div \text{反应时间(1min)} \div \text{NADH 消光系数 (6.22} \times 10^{-3}) \times \Delta A \div \text{蛋白质浓度 (mg/mL)} = 4823 \times \Delta A \div \text{蛋白质浓度 (mg/mL)}$$

（2）按样本鲜重计算：

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

$$\text{NAD-ME (U/g 鲜重)} = \text{反应总体积 (900}\mu\text{L)} \div \text{样本体积 (30}\mu\text{L)} \div \text{反应时间(1min)} \div \text{NADH 消光系数 (6.22} \times 10^{-3}) \times \Delta A \div \text{样品质量 (g/mL)} = 4823 \times \Delta A \div \text{样品质量 (g/mL)}$$

（3）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 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/10}^4 \text{ cell)} = \text{反应总体积 (900}\mu\text{L)} \div \text{样本体积 (30}\mu\text{L)} \div \text{反应时间(1min)} \div \text{NADH 消光系数 (6.22} \times 10^{-3}) \times \Delta A \div \text{细菌或细胞密度 (10}^4 \text{/mL)} = 4823 \times \Delta A \div \text{细菌或细胞密度 (10}^4 \text{/mL)}$$

（4）按液体计算：

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

$$\text{NADP-ME (U/ml)} = \text{反应总体积 (900}\mu\text{L)} \div \text{样本体积 (30}\mu\text{L)} \div \text{反应时间(1min)} \div \text{NADPH 消光系数 (6.22} \times 10^{-3}) \times \Delta A = 4823 \times \Delta A$$