

NADP-苹果酸酶(NADP-ME)试剂盒说明书

(货号: PB1034W96 微量法 96 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:

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

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

提取液: 100mL×1 瓶, 4℃ 保存。

试剂一: 液体 20mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 液体 10mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂三: 粉剂×1 瓶, -20℃ 保存;

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。

测定步骤:

1、分光光度计/酶标仪预热 30min 以上,调节波长至 340nm。

2、检测工作液的配制: 用时在试剂三中加入 15mL 试剂一和 5.5mL 试剂二和 1mL 双蒸水,充分混匀待用。

3、测定前将检测工作液在 37℃ (哺乳动物)或 25℃ (其它物种)水浴 10min 以上。

4、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μL 样本和 215 μL 工作液,混匀后立即记录 340nm 处初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2,计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

注意: 如果 $\Delta A < 0.01$,可将反应时间延长到 2 分钟或 5 分钟。

NADP-ME 活性计算:

a. 用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(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。

$$\text{NADP-ME (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 3617 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 3617 \times \Delta A \div W$$

(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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 7.235 \times \Delta A$$

(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。

$$\text{NADP-ME (U/ml)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 3617 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 2.25×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 mol/L/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 1 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; 500: 细胞总数, 500 万。

b. 用 96 孔板测定的计算公式如下

(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。

$$\text{NADP-ME (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (Cpr \times V_{\text{样}}) \div T = 7235 \times \Delta A \div Cpr$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

(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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 7235 \times \Delta A \div W$$

(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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 14.469 \times \Delta A$$

(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。

$$\text{NADP-ME (U/ml)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 7235 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积, 2.25×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 mol/L/cm; d: 96 孔板光径, 0.5cm; V 样: 加入样本体积, 0.01 mL; V 样总: 加入提取液体积, 1 mL; T: 反应时间, 1 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量; 500: 细胞总数, 500 万。