

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

(货号: BP10394W 微板法 96 样 有效期: 3 个月)

一、指标介绍:

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 CO_2 , 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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 100mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	粉剂 1 支	-20℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂四	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	粉剂 1 支	4℃保存	1. 临用前 8000g 4° C 离心 2min 使试剂落入管底 (可手动甩一甩); 2. 加入 1.1mL 蒸馏水溶解; 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

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℃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 液体样品: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

- ③ 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℃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

2、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上（等仪器过自检程序亦可），调节波长至 340nm。
- ② 所有试剂放在 25℃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：

试剂组分（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℃）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、按样本鲜重计算：

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

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

2、按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：25℃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。

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

3、按照液体体积计算：

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

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

4、按细菌/细胞密度计算：

酶活定义：25℃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。

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

ϵ ---NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/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，200μL = 2×10^{-4} 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。