

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

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 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<sub>2</sub>,以及伴随 NAD(P)<sup>+</sup>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<sup>+</sup>还原成 NADH,在 340nm 下测定 NADH 增加速率。

### 组成:

产品名称	AE008-100T/96S	Storage
提取液:	100ml	4°C
试剂一: 液体	20ml	4°C
试剂二: 液体	10ml	4°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	-20°C
说明书	一份	

### 自备仪器和用品:

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。

### 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,离心后弃上清;按照细菌或细胞数量(10<sup>4</sup>个):提取液体积(ml)为 500~1000:1 的比例(建议 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);8000g 4°C离心 10min,取上清,置冰上待测。

组织:按照组织质量(g):提取液体积(ml)为 1:5~10 的比例(建议称取约 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)样品:直接检测。

最终解释权所有 © 伊势久(江苏连云港)生物科技有限责任公司,保留一切权利



## 测定步骤:

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、检测工作液的配制: 用时在试剂三中加入 15ml 试剂一和 1ml 蒸馏水, 充分混匀待用; 用不完的试剂分装后-20°C保存, 禁止反复冻融。
- 3、测定前将检测工作液在 37°C (哺乳动物) 或 25°C (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 10μl 样本、55μl 试剂二和 160μl 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 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

注意: 如果 $\Delta A < 0.005$ , 可将反应时间延长到 2 分钟或 5 分钟。

## NAD-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 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

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 g 组织每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

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

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 7.234 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积,  $2.25 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L / mol / 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: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 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 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 7234 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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 g 组织每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 7234 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 14.468 \times \Delta A$$



V 反总: 反应体系总体积,  $2.25 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : NADH 摩尔消光系数,  $6.22 \times 10^3$  L / mol; 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: 样本质量; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

