

NADP-苹果酸酶 (Malic enzyme , NADP-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 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)。

测定原理:

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

组成:

产品名称	AE010-100T/96S	Storage
提取液:	100ml	4°C
试剂一: 液体	30ml	4°C
试剂二: 粉剂	1 瓶	-20°C
试剂三: 粉剂	1 瓶	-20°C
说明书	一份	

试剂二: 粉剂×1 瓶, -20°C 保存; 临用前加入 **20ml 试剂一**充分振荡, 溶解待用, 用不完的试剂分装后-20 度保存, 禁止反复冻融。

试剂三: 粉剂×1 瓶, -20°C 保存; 临用前加入 **2.5ml 蒸馏水**充分振荡, 溶解待用, 用不完的试剂分装后-20 度保存, 禁止反复冻融。

自备仪器和用品:

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。

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 (10⁴ 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

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



细胞（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；14000g 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。14000g 4°C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、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，蒸馏水调零。
- 2、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10 μ l 样本和 170 μ l 试剂二，混匀，30°C孵育 5min，加入 20 μ l 试剂三，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 $\Delta A=A_2-A_1$ 。

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 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 3215 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3215 \times \Delta A \div W$$

(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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 6.43 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，2 $\times 10^{-4}$ L； ϵ ：NADPH 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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 6431 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 6431 \times \Delta A \div W$$

(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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 12.86 \times \Delta A$$



V 反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : NADPH 摩尔消光系数, 6.22×10^3 L / mol/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: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500 万。

