

# NADP-苹果酸酶 (NADP-ME) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1221

产品规格: 100管/96样

## 产品简介:

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)。

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

**注意: 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

## 产品内容:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体110mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体20mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×1支	2-8℃
试剂四	粉剂×1支	-20℃

## 溶液的配制:

1. 试剂二: 用时加入10mL提取液充分溶解备用;
2. 试剂三: 用时加入用时每支加1mL双蒸水充分溶解备用;
3. 试剂四: 用时每支加500μL双蒸水充分溶解备用;
4. 工作液: 在7.5mL试剂二中加入1mL试剂三和0.5mL试剂四,可以根据比例现用现配。

## 需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵/匀浆器和蒸馏水。

## 操作步骤:

### 一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献)

#### 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。

### 二、测定步骤:

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热30min以上, 调节波长至340nm, 蒸馏水调零。
2. 将试剂一在37℃ (哺乳动物) 或25℃ (其它物种) 中保温15min左右。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

QQ: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

### 3. 操作表:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	200
工作液	90
样本	10

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿/96孔UV板中混匀, 在37℃ (哺乳动物) 或25℃ (其它物种), 340nm波长下记录初始吸光度A1和反应1min后的吸光度A2, 计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

### 三、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. 组织中NADP-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1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 4823 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算:

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

$$\text{NADP-ME (U/g鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 4823 \times \Delta A \div W$$

##### 2. 细菌或细胞中NADP-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1nmolNADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 4823 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按细菌或细胞数量计算:

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1nmol NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 9.65 \times \Delta A$$

##### 3. 血清(浆)中NADP-ME活力的计算:

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

$$\text{NADP-ME (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 4823 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积,  $3 \times 10^{-4}$ L;  $\epsilon$ : 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, 0.01mL; V样总: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 1min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500万;  $10^9$ : 单位换算系数,  $1\text{mol} = 10^9\text{nmol}$ 。

#### b. 用96孔板测定的计算公式

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm进行计算。

### 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. 实验时, 试剂三、试剂四和样本在冰上放置, 以免变性和失活。试剂一37℃或25℃水浴放置。
3. 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。用96孔板做时尽量保持反应温度在37℃或25℃。
4. 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。用96孔板做时尽量做到样本反应时间一致。
5. 如果 $\Delta A < 0.01$ , 可将反应时间延长5分钟或10分钟。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com