

## NAD-苹果酸酶 (NAD-ME) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1223

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)。

NAD-ME催化NAD<sup>+</sup>还原成NADH,在340nm下测定NADH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: 临用前加入10mL提取液充分溶解备用;
2. 试剂三: 临用前每支加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UV板、研钵/匀浆器、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、细胞或组织样本的制备:

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)样本: 直接检测。

#### 二、测定操作

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。



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

2. 将试剂一在37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）中保温15min左右。

3. 操作表：

试剂名称（mL）	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5min后的吸光度A2，计算  $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

### 三、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. 组织中NAD-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 NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 965 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本质量计算：

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

$$\text{NAD-ME (U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 965 \times \Delta A \div W$$

2. 细菌或细胞中NAD-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 NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 965 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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 NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 1.93 \times \Delta A$$

3. 血清中NAD-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1 nmol NADH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 965 \times \Delta A$$

V反总：反应体系总体积， $3 \times 10^{-4}$ 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，0.01mL；V样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，5min；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； $10^9$ ：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A2-A1大于0.5，需将样本用提取液稀释，使A2-A1小于0.5，可提高检测灵敏度。
2. 实验时，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 $\Delta A < 0.01$ ，可将反应时间延长到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