

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：

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

需自备的仪器和用品：

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。

试剂的组成和配制：

提取液：100mL×1瓶，4℃保存。；

试剂一：液体20mL×1瓶，4℃保存；

试剂二：液体10mL×1瓶，4℃保存；

试剂三：粉剂×1瓶，-20℃保存；

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），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率20%或200W，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：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℃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. 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℃保存，禁止反复冻融。
3. 测定前将检测工作液在37℃（哺乳动物）或25℃（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ΔA=A₂-A₁。

注意：如果ΔA<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。

$$\text{NAD-ME (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 3617 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{NAD-ME (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3617 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{NAD-ME (nmol/min/104 cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 7.234 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积, 2.25×10⁻⁴ L; ε: NADH摩尔消光系数, 6.22×10³ 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。

$$\text{NAD-ME (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 7234 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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。

$$\text{NAD-ME (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 7234 \times \Delta A \div W$$

(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。

NAD-ME (nmol/min/104 cell) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 109] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 14.468 \times \Delta A$
V反总: 反应体系总体积, 2.25×10⁻⁴ L; ε: NADH摩尔消光系数, 6.22×10³ 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。