

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

分光光度法 50 管/48 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、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。

试剂的组成和配制:

提取液: 60mL×1 瓶, 4℃ 保存。;

试剂一: 液体 40mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 液体 20mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂三: 粉剂×1 支, 4℃ 保存; 用时加 2mL 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融。

试剂四: 粉剂×1 支, -20℃ 保存; 用时加 1mL 蒸馏水充分溶解备用; 用不完的试剂分装后-20℃ 保存, 禁止反复冻融。

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、分光光度计预热 30min 以上,调节波长至 340nm,蒸馏水调零。

2、将试剂一、二、三和四置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 10min 以上。如果一次性测定样本较多,可将试剂一、二、三和四按下表比例配成混合液后置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 10min 以上 (现配现用)。

3、操作表:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	600
试剂二	225
试剂三	30
试剂四	15
样本	30

将上述试剂按顺序加入 1 mL 石英比色皿中，混匀，立即记录 340 nm 波长下初始吸光度 A1 和反应 1min 后的吸光度 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：

(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。

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

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。

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

(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。

$$\text{NAD-ME (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 9.646 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 9×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；

V 样：加入样本体积，0.03 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。