

NADP-苹果酸酶 (Malic enzyme , NADP-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:

NADP-ME 催化 NADP⁺还原成 NADPH,在 340nm 下测定 NADPH 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 60mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 粉剂×1 瓶, -20℃ 保存; 临用前加入 50mL 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℃ 保存; 临用前加入 6mL 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。

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); 14000g 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。14000g 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、在 1mL 石英比色皿中加入 50 μL 样本和 850 μL 试剂二,混匀,30℃ 孵育 5min,加入 100 μL 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 ΔA=A2-A1。

NADP-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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

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。

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

(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。

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

$V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积， 1×10^{-3} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm； d ：比色皿光径，1cm；

$V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.1 mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； T ：反应时间，1 min； C_{pr} ：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。