

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)。

NAD-ME催化NAD⁺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瓶	2-8℃
试剂四	粉剂×1瓶	-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

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

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

- 组织中NAD-ME活力的计算：

- 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。

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

- 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。

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

- 细菌或细胞中NAD-ME活力的计算：

- 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。

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

- 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。

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

- 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， 3×10^{-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，0.01mL；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：

- 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。
- 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。
- 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℃。
- 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。
- 如果 $\Delta A < 0.01$ ，可将反应时间延长到10分钟。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q：807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com