

NAD-苹果酸酶 (Malic enzyme , NAD-ME) 试剂盒说明书**微量法 100 管/96 样**

注 意：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 CO_2 ，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 (10^4 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 10 μL 样本、55 μL 试剂二和 160 μL 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 $\Delta A = A2 - A1$ 。
- 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：

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。

$$\text{NAD-ME (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 3617 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 3617 \times \Delta A \div W$$

（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。

$$\text{NAD-ME (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 7.234 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 2.25×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 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。

$$\text{NAD-ME (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 7234 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

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 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 7234 \times \Delta A \div W$$

（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。

$$\text{NAD-ME (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 14.468 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 2.25×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 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。