



NADP 苹果酸酶 (NADP-ME) 检测试剂盒

NADP Malic Enzyme Assay Kit

微量法

产品编号: AK277

产品规格: 100T/96S

产品组成及保存条件:

编号	规格	储存条件
ES277	100mL×1 瓶	4℃保存
AK277-A	15 mL×1 瓶	4℃保存
AK277-B	5mL×1 瓶	4℃保存
AK277-C	粉剂×1 瓶	4℃保存; 用时加入 0.8mL 蒸馏水, 溶解后 4℃可保存一周
AK277-D	粉剂×1 瓶	-20℃保存; 用时加入 0.5mL 蒸馏水, 溶解后备用, 现用现配

※ 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定。

简介:

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。

原理: NADP-ME 催化 NADP⁺还原成 NADPH, 在 340nm 下测定 NADPH 增加速率。

自备用品:

可见分光光度计/酶标仪、恒温水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、研钵、冰和蒸馏水

样品制备:

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 (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, 调节波长至 340nm。

2. 将试剂 A、B、C 和 D 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 A、B、C 和 D 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 (混合液现配现用)。

3. 酶促反应 (按顺序加入下列试剂):

试剂名称	对照管 (μL)
试剂 A	120
试剂 B	45
试剂 C	6
试剂 D	3

样本	6
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 $\Delta A = A2 - A1$ 。 注：如果 $\Delta A < 0.005$ ，可将反应时间延长到 2 分钟或 5 分钟。	

计算公式：

a.使用石英比色皿测定：

1. 按组织蛋白浓度计算：

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。

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

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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

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

注：V 反总：反应体系总体积， 1.8×10^{-4} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：比色皿光径，1 cm；V 样：加入样本体积，0.006 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.使用 96 孔板测定：

1. 按组织蛋白浓度计算：

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。

$$\text{NADP-ME (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 9646 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 9646 \times \Delta A \div W$$

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。

$$\text{NADP-ME (U/10}^4\text{cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 19.292 \times \Delta A$$

注：V 反总：反应体系总体积， 1.8×10^{-4} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：比色皿光径，0.5 cm；V 样：加入样本体积，0.006 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。