



NADP苹果酸酶(NADP-ME)试剂盒

可见分光光度法

货号: R45039-48S

产品简介:

苹果酸酶是生物体内重要的酶之一,广泛存在于动物、植物、细菌体中。是苹果酸代谢的关键酶。近年来植物ME 活性测定较多,已经成为抗氧化研究的热点。该酶发挥作用需要辅酶因子的参与,依据辅酶因子的不同,分为NADP-ME(EC 1.1.1.40)和NAD-ME(EC 1.1.1.38)。

ME 的主要功能是催化苹果酸氧化脱羧产生丙酮酸和CO₂,以及伴随NAD(P)⁺的还原反应,NADP-ME 催化NADP⁺还原成NADPH,本试剂盒通过检测NADPH在340nm 处的增加速率即可得出NADP-ME的酶活性大小。

试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体50mL×1瓶	4℃保存	
试剂一	粉剂mg×1支	-20℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加1.2mL蒸馏水溶解。
试剂二	液体20mL×1瓶	4℃保存	
试剂三	粉剂mg×1支	4℃保存	用前甩几下或离心使试剂落入底部,再加1.2mL蒸馏水溶解。

所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿(光径1cm)、水浴锅、台式离心机、可调式移液器。

NADP-苹果酸酶 (NADP-ME) 活性测定:

建议正式实验前选取2个样本做预测定,了解本批样品情况,熟悉实验流程,避免实验样本和试剂浪费!



1、样本制备:

①组织样本:

称取约0.1g 组织, 加入1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。12000rpm, 4℃ 离心10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】:按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为1:5~10的比例。

②细菌/培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 取约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); 12000rpm, 4℃离心10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】:若增加样本量, 可按细菌/细胞数量(10^4 个):提取液 (mL) 为1000~5000:1的比例进行提取

③液体样品: 直接检测。若浑浊, 离心后取上清检测。

2、上机检测:

①可见分光光度计预热30min 以上, 调节波长至340nm, 蒸馏水调零。

②所有试剂放在25℃水浴10min;

③在1mL玻璃比色皿(光径1cm)中依次加入:

试剂名称(μL)	测定管
样本	40
试剂一	20
试剂二	680
试剂三	20
混匀, 立即于340nm下读取A1值, 室温 (25℃)下, 3min后读取A2值。△A=A2-A1。	

结果计算:

1、按样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 25℃条件下, 每毫克组织蛋白每分钟生成1nmol NADPH定义为一个酶活单位。

$$\text{NADP-ME}(\text{nmol/min/mg prot}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_1) \div T$$



$$=1018.2 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

2、按样本鲜重计算:

酶活定义: 25℃条件下, 每克组织每分钟生成1 nmol NADPH定义为一个酶活单位。

$$\text{NADP-ME}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T$$

$$=1018.2 \times \Delta A \div W$$

3、按细菌/细胞密度计算:

酶活定义: 25℃条件下, 每1万个细菌/细胞每分钟生成1nmol NADPH定义为一酶活单位。

$$\text{NADP-ME}(\text{nmol/min}/10^4\text{cell}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (V_1 \div V \times 500) \div T$$

$$=2.04 \times \Delta A$$

4、按照液体体积计算:

酶活定义: 25℃条件下, 每毫升液体每分钟生成1nmol NADPH 定义为一个酶活单位。

$$\text{NADP-ME}(\text{nmol/min/mL}) = [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div V_1 \div T$$

$$=1018.2 \times \Delta A$$

ϵ ---NADPH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{L/mol}$;

V---加入提取液体积, 1mL;

V1---加入样本体积, 0.07mL;

V2--- 反应总体积, $760\mu\text{L} = 7.6 \times 10^{-4}\text{L}$;

T-- 反应时间, 3min;

W---样本质量;

d---光径, 1cm;

500---细菌或细胞总数, 500万;

Cpr---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的BCA蛋白含量检测试剂盒。