



NAD-苹果酸酶(NAD-ME)试剂盒

可见分光光度法

货号: R45040-48S

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NAD-ME(EC 1.1.1.38)和NADP-ME(EC 1.1.1.40)。

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NAD⁺还原成NADH, 本试剂盒通过检测NADH 在340nm 处的增加速率即可得出NAD-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	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。
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。
试剂四	液体40mL×1瓶	4℃保存	
试剂五	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、蒸馏水。

NAD-苹果酸酶 (NAD-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试剂二、三和四可按照操作表加样体系以20:20:680的比例混合, 一次性取出720 μ L。

④ 在 1mL 玻璃比色皿(光径1cm) 中依次加入:

试剂名称(μ L)	测定管
样本	40
试剂一	20
试剂二	20
试剂三	20
试剂四	680
试剂五	20
混匀, 立即于340nm下读取A1值, 室温 (25℃)下, 3min后读取A2值。 $\Delta A = A2 - A1$ 。	

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1 nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{NAD-ME}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_1) \div T \\ &= 1071.8 \times \Delta A \div \text{Cpr}\end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算:

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

$$\begin{aligned}\text{NAD-ME}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (W \times V_1 \div V) \div T \\ &= 1071.8 \times \Delta A \div W\end{aligned}$$

4、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1 nmol NADH 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{NAD-ME}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div (V_1 \div V \times 500) \div T \\ &= 2.14 \times \Delta A\end{aligned}$$

5、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 NADH定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned}\text{NAD-ME}(\text{nmol}/\text{min}/10^4\text{cell}) &= [\Delta A \div (\epsilon \times d) \times V_2 \times 10^9] \div V_1 \div T \\ &= 1071.8 \times \Delta A\end{aligned}$$

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

V--- 加入提取液体积, 1mL;

V1--- 加入样本体积, 0.04mL;

V2--- 反应总体积, $800\mu\text{L} = 8 \times 10^{-4}\text{L}$;

T-- 反应时间, 3min;

W---样本质量;



上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话: 400-666-5481 传真: 021-55068248
网址: www.shyuanye.com
邮箱: 3008007435@qq.com

d--- 光径, lcm;

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。



源叶