

NAD-苹果酸酶（NAD-ME）检测试剂盒（微量法）

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

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 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)。

测定原理：

NAD-ME 催化 NAD⁺还原成 NADH，在 340nm 下测定 NADH 增加速率。

试剂组成和配制：

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（10⁴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 10μL 样本、55μL 试剂二和 160μL 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。

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

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 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。

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

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 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。