

NAD-苹果酸酶 (NAD-ME) 检测试剂盒 (微量法)

货号：PMK1016

保存：-20℃避光保存 12 个月

规格：48T/96T

适用样本：动植物组织、细胞、细菌、血清（浆）等液体样本

产品简介

苹果酸酶 (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)。本试剂盒提供了一种简单、方便、快速的 NAD-ME 活性检测方法，其原理是 NAD-ME 催化 NAD⁺ 还原成 NADH，NADH 在 340nm 处有特征吸收峰，在 340nm 下测定 NADH 增加速率可计算获得 NAD-ME 的活性。

产品内容

试剂盒组分	规格		储存条件
	48T	96T	
提取液	50mL	100mL	4℃ 保存
试剂一	10mL	20mL	4℃ 保存
试剂二	5mL	10mL	4℃ 保存
试剂三	粉剂 × 1 瓶	粉剂 × 1 瓶	-20℃ 避光保存

自备耗材

酶标仪或分光光度计（能测 340nm 处的吸光度）
 96 孔 UV 板或微量石英比色皿、可调节式移液枪及枪头
 水浴锅、制冰机，低温离心机
 去离子水
 匀浆器（如果是组织样本）

试剂准备

提取液：即用型；4℃ 保存。
 试剂一：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。
 试剂二：即用型；使用前，平衡到室温；4℃ 保存。
 工作液：临用前配制，对于 48T，在试剂三中加入 7.5mL 试剂一和 0.5mL 去离子水；对于 96T，在试剂三中加入 15mL 试剂一和 1mL 去离子水。充分混匀待用；未用完的试剂分装 -20℃ 避光保存，避免反复冻融。

样本制备

动植物组织：称取约 0.1g 样本，加入 1mL 提取液冰浴匀浆，8,000g，4℃ 离心 10min，取上清液置冰上待测。
 细胞或细菌：收集 500 万细胞或细菌到离心管内，用冷 PBS 清洗细胞，离心后弃上清，加入 1mL 提取液，超声波破碎细胞或细菌 5min（功率 20%或 200W，超声 3s，间隔 7s，重复 30 次），8,000g，4℃ 离心 10min，取上清液置冰上待测。
 血清（浆）等液体样本：直接测定，根据预实验确定稀释倍数。
注意：推荐使用新鲜样本，如果不立即进行实验，样本可在 -80℃ 保存 1 个月。如需测定蛋白浓度，推荐使用 BCA 法蛋白质定量试剂盒进行样本蛋白质浓度测定。

实验步骤

1. 酶标仪或分光光度计预热 30min 以上，调节波长到 340nm。分光光度计去离子水调零。
2. 工作液于 37℃（哺乳动物）或 25℃（其它物种）水浴 10min 以上。
3. 在 96 孔 UV 板或微量石英比色皿中依次加入 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 A_1 和 1min 后的吸光值 A_2 ，计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

注意：1. 实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果 ΔA 小于 0.001 可将反应时间延长到 2 分钟或 5 分钟，计算时调整公式中的时间；如果 ΔA 大于 0.3，可用提取液稀释样品，计算时结果乘以稀释倍数。

2. 测定反应的温度对测定结果有影响，请控制在 25℃（一般物种）或者 37℃（哺乳动物）。
3. 因通过反应速率计算酶活，使用 96 孔 UV 板时请根据操作速度控制一次测定的样本数（通常一次测定 4-8 个样本），不推荐同时测多个样本。

结果计算

A. 用 96 孔板测定的计算公式如下

1. 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 7235 \times \Delta A \div W$$

2. 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟生成 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 14.469 \times \Delta A$$

3. 按液体体积计算：

单位的定义：每 mL 液体样本在反应体系中每分钟生成 1nmol 的 NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 7235 \times \Delta A$$

4. 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟生成 1nmol NADH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反应}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 7235 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

此法需要自行测定样本蛋白质浓度。

$V_{\text{反应}}$ ：反应体系总体积， 2.25×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 mol/L/cm； d ：96 孔板光径，0.5cm； $V_{\text{样}}$ ：加入样本体积，0.01mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1mL； T ：反应时间，1min； Cpr ：样本蛋白质浓度，mg/mL； W ：样品质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。

B. 使用微量石英比色皿测定的计算公式

将上述计算公式中的光径 d :0.5cm 调整为 d :1cm 进行计算即可。

注意事项

1. 实验过程中请穿戴实验服、口罩和乳胶手套。请按照生物实验室的国家安全规定进行实验，尤其是在检测血样或其他体液时。
2. 本试剂盒仅用于实验室科学研究，如果本试剂盒用于临床诊断或任何其他用途，我们将不对任何后果负责。
3. 本试剂盒应在有效期内使用，并请严格按照说明书进行存储。
4. 不同批次号、不同厂家之间的组分不要混用；否则，可能导致结果异常。
5. 勤换吸头，避免各组分之间的交叉污染。

相关产品：

PMK1013 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 (G6PDH) / 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶检测试剂盒 (微量法)

PMK1014 胞浆异柠檬酸脱氢酶 (ICDHc) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1015 NADP 苹果酸酶 (NADP-ME) 检测试剂盒 (微量法)

PMK1114 线粒体苹果酸脱氢酶 (MDHm) 检测试剂盒 (微量法)

更多产品详情了解，请关注公众号：

