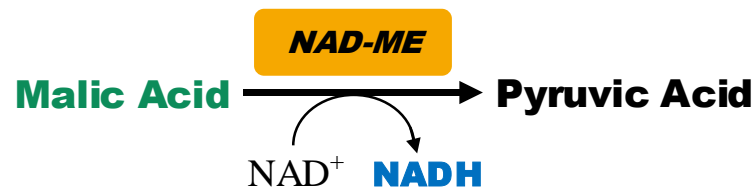




NAD-苹果酸酶 (NAD-ME) 活性检测试剂盒
NAD-Malic Enzyme (NAD-ME) Activity Assay Kit



NAD-苹果酸酶 (NAD-ME) 活性检测试剂盒

NAD-Malic Enzyme (NAD-ME) Activity Assay Kit

一、产品描述

苹果酸酶 (ME) 广泛存在于动植物、微生物和培养细胞中, 尤其在植物组织中活性较高, 根据不同的辅酶特异性, 苹果酸酶分为 NAD-依赖型和 NADP-依赖型。苹果酸酶能够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, 是苹果酸代谢过程的关键酶, 其活性与生物合成和抗氧化密切相关。

NAD-苹果酸酶能够催化苹果酸和 NAD⁺ 生成丙酮酸和 NADH, NADH 在 340 nm 处具有特征吸收峰, 通过吸光值变化速率即可表征 NAD-苹果酸酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用说明及注意事项
提取液	液体 70 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 40 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	液体 17 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂三	粉剂×1 瓶	4°C 保存	使用前每支加入 2 mL 蒸馏水充分溶解
试剂四	粉剂×1 支	-20°C 保存	使用前每支加入 1 mL 蒸馏水充分溶解
检测工作液的制备 (现用现配): 根据使用量按照试剂二: 试剂三: 试剂四=15:2:1 的体积比配制, 充分混匀即为检测工作液。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂: 紫外分光光度计、1 mL 石英比色皿 (光径 10 mm)、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴/培养箱和蒸馏水。

1. 粗酶液的制备 (可根据预实验结果适当调整样品量及比例)

① 细菌或细胞: 离心收集细菌或细胞至离心管内, 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 1 mL 提取液) 处理样品, 冰浴超声破碎 (功率 20% 或 200 W, 超声 3 s, 间隔 10 s, 重复 30 次); 4°C 8000 g 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。

②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 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）处理样品，冰浴匀浆，4°C 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

③血清（浆）、培养液等液体样品：直接检测或适当稀释后再进行检测。

2. 测定步骤

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

②试验前将试剂一 37°C（哺乳动物）或 25°C（其它物种）预热 15 min。

③在 1 mL 石英比色皿中加入下列试剂：

试剂	测定组 (μL)
粗酶液	30
试剂一	600
检测工作液	270

吸光值测定：①充分混匀并立即开始计时，测定 10 s 时（总时间）340 nm 处吸光值，记为 A1；

②准确反应 60 s，测定 70 s（总时间）时 340 nm 处吸光值，记为 A2；③计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

3. NAD-苹果酸酶（NAD-ME）活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/mg prot)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}} \times T} = \frac{4823.15 \times \Delta A}{C_{\text{pr}}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/g)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times W \times T} = \frac{4823.15 \times \Delta A}{W}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times V_{\text{样总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times \text{细菌或细胞数量} \times T} = \frac{4823.15 \times \Delta A}{\text{细菌或细胞数量}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟生成 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/mL)} = \frac{\Delta A \times V_{\text{反总}} \times 10^9}{\epsilon \times d \times V_{\text{样}} \times T} = 4823.15 \times \Delta A$$

注释： V 样：反应体系中加入粗酶液的体积，0.03 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；V 反总：反应体系总体积， 9×10^{-4} L； ϵ ：NADH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L/mol/cm；d：1 mL 石英比色皿光径，1 cm；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL；细胞或细菌数量：以万计；T：反应时间，1 min； 10^9 单位换算系数：1 mol= 10^9 nmol。

四、注意事项

- ①粗酶液制备过程必须在冰上进行，保持低温环境以防止酶变性失活；
- ②试验过程中试剂三、试剂四和粗酶液需置于冰上放置，以防止变性和失活；
- ③若 ΔA 大于 0.5，建议将粗酶液适当稀释后再进行测定，计算时相应修改；
- ④准确在 10 s 和 70 s 处完成测定，以确保实验结果的准确性和重复性；
- ⑤为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

boxbio

Manufactured and Distributed by

Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.
Liandong U Valley, Tongzhou District, Beijing, China

TEL: 400-805-8228

E-MAIL: techsupport@boxbio.cn

Copyright © 2020 Boxbio, All Rights Reserved.

