

NAD-苹果酸酶（NAD-ME）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHF7-M48	NAD-苹果酸酶（NAD-ME）活性检测 试剂盒说明书	48T	微量法
AMHF7-M96		96T	

一、测定意义：

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。

二、测定原理：

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。

三、试剂组成：

试剂名称	试剂装量(48T)	试剂装量(96T)	保存条件
提取液	液体 50mL×1 瓶	液体 100mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 3mL×1 瓶	液体 6mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 3mL×1 瓶	液体 6mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃保存
试剂三：用时每瓶粉剂加入蒸馏水 5mL，混匀充分溶解，-20℃保存 1 周，避免反复冻融。			
试剂四	粉剂 ×1 瓶	粉剂 ×2 瓶	-20℃保存
试剂四：用时每瓶粉剂加入蒸馏水 5mL，混匀充分溶解，-20℃保存 1 周，避免反复冻融。			

四、操作步骤：

样本前处理

- 1、组织：按照组织质量（g）:提取液(mL)为1:10 的比例（建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液）进行冰浴匀浆。5000 rpm，4℃离心 10 min，取上清置冰上待测。
- 2、细菌、细胞：按照细胞数量 10⁴ 个：提取液体积（mL）500~1000:1 的比例（建议 500 万细胞加入 1 mL 提取液），冰浴超声波破碎细胞（功率 300w，超声 3s，间隔 7s，总时间 3 min），5000 rpm，4℃离心 10min，取上清置冰上待测。

测定步骤

1. 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至340nm。
2. 测定前将试剂恢复至常温；
3. 操作表（在96孔UV板中加入以下试剂）：

	测定管	空管
样品（ μL ）	40	-
双蒸水（ μL ）	-	40
试剂一（ μL ）	40	40
试剂二（ μL ）	40	40
试剂三（ μL ）	40	40
试剂四（ μL ）	40	40
充分混匀，记录 340nm 处 20s 时吸光值 A1 和 5min20s 时的吸光值 A2，计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}}$ 。 $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}}$ ； $\Delta A = \Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}$ 。（空白管只做 1-2 管）		

四、NAD-苹果酸酶（NAD-ME）酶活性计算：

1、组织、细胞样本 NAD-苹果酸酶（NAD-ME）计算

(1) 按样本鲜重计算：

单位定义： 每克组织每分钟生成 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = \Delta A \times 0.268 \times 10^3 \div W$$

(2) 按样本蛋白浓度计算：

单位定义： 每毫克蛋白每分钟生成 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = \Delta A \times 0.268 \times 10^3 \div C_{\text{pr}}$$

(3) 按细菌或细胞数量计算：

单位定义： 每 1 万个细菌或细胞每分钟生成 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

$$\text{NAD-ME (U/104 cell)} = (U/104 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = \Delta A \times 0.536$$

V 反总： 反应体系总体积， 1×10^{-3} L；

ϵ ： NADH， 6.22×10^3 L/mol/cm；

d： 比色皿光径，0.6cm；

V 样： 加入样本体积，0.04mL；

V 样总： 加入提取液体积，1mL；

T: 反应时间, 5min;

Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL;

10⁹: 单位换算系数, 1mol=10⁹nmol;

W: 样本质量, g;

500: 细菌或细胞总数, 500 万。

五、 注意事项:

1、实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测;