

NAD-苹果酸酶（NAD-ME）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC1135

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 25 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二	液体 10 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂三	粉剂×1 支	2-8℃保存
试剂四	粉剂×1 支	-20℃保存

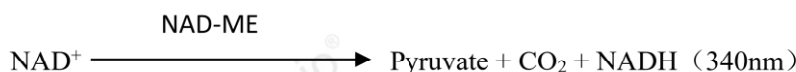
溶液的配制：

- 1、试剂三：临用前加入 1mL 蒸馏水充分溶解备用，用不完的试剂 2-8℃可保存 4 周；
- 2、试剂四：临用前加入 500μL 蒸馏水充分溶解备用，可分装后-20℃保存 4 周，避免反复冻融；
- 3、工作液的配制：临用前根据样本量按照试剂二：试剂三：试剂四=225μL：30μL：15μL（270μL，约 3T）的比例配制工作液，现用现配。

产品说明：

NAD-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）。

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



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。

需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅/恒温培养箱、可调节移液器、微量石英比色皿/96孔UV板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1、细菌、细胞或组织样本的制备：

细菌或培养细胞：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）=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 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：组织样本：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）样本：直接检测。若有浑浊可离心后取上清使用。

二、测定步骤

1、紫外分光光度计/酶标仪预热30min以上，调节波长至340nm，紫外分光光度计蒸馏水调零。

2、将试剂一在37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）中保温15min左右。

3、操作表：

试剂名称（μL）	测定管
试剂一	200
工作液	90
样本	10

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿/96孔UV板中混匀，在37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种），340nm波长下记录初始10s吸光度A1和反应5min后的吸光度A2，计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

注：若一次性测定样本量较多，可将试剂一和工作液按比例配成混合液，测定时加入10μL样本和290μL混合液测定。

三、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组织蛋白在反应体系中每分钟生成1nmol NADH定义为一个酶活性单位。

$$\text{NAD-ME (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \times F = 965 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \times F$$

2、按样本质量计算：

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

$$\text{NAD-ME (U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \times F = 965 \times \Delta A \div W \times F$$

3、按细菌或细胞数量计算：

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定义为一个酶活性单位。

$$\text{NAD-ME (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times N) \div T \times F = 965 \times \Delta A \div N \times F$$

4、血清中NAD-ME活性的计算：

单位的定义：每mL血清在反应体系中每分钟生成1nmol NADH定义为一个酶活性单位。

$$\text{NAD-ME (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T \times F = 965 \times \Delta A \times F$$

V反总：反应体系总体积，3×10⁻⁴L；ε：NADH摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：微量石英比色皿光

径，1cm；V样：加入样本体积，0.01mL；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；W：样本质量，g；N：细菌或细胞总数，以万计；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol；F：稀释倍数。

b.用96孔UV板测定的计算公式

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm进行计算。

注意事项：

1、若ΔA大于0.5，需将样本用提取液稀释，使ΔA小于0.5，可提高检测灵敏度。



- 2、实验时，样本在冰上放置，以免变性和失活。试剂一37℃或25℃水浴放置。
- 3、微量石英比色皿中反应液的温度必须保持37℃或25℃，取小烧杯一只装入一定量的37℃或25℃蒸馏水，将此烧杯放入37℃或25℃水浴锅中。在反应过程中把微量石英比色皿连同反应液放在此烧杯中。用96孔UV板做时尽量保持反应温度在37℃或25℃。
- 4、最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。用96孔UV板做时尽量做到样本反应时间一致。
- 5、如果 $\Delta A < 0.01$ ，可将反应时间延长（10min或更长），注意同步修改计算公式。

相关发表文献：

[1] Yu J, You X, Wang Y, Jin C, Zhao Y, Guo L. Focus on the role of synthetic phytohormone for mixotrophic growth and lipid accumulation by *Chlorella pyrenoidosa*. *Chemosphere*. 2022 Dec;308 (Pt 3):136558. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.136558. Epub 2022 Sep 20. PMID: 36150488.

[2] Fan W, He ZS, Zhe M, Feng JQ, Zhang L, Huang Y, Liu F, Huang JL, Ya JD, Zhang SB, Yang JB, Zhu A, Li DZ. High-quality *Cymbidium mannii* genome and multifaceted regulation of crassulacean acid metabolism in epiphytes. *Plant Commun*. 2023 Sep 11;4 (5):100564. doi: 10.1016/j.xplc.2023.100564. Epub 2023 Feb 21. PMID: 36809882; PMCID: PMC10504564.

参考文献：

[1] Spampinato C P, Colombo S L, Andreo C S. Interaction of analogues of substrate with NADP-malic enzyme from maize leaves[J]. *Photosynthesis research*, 1994, 39 (1) : 67-73.

相关系列产品：

- BC0310/BC0315 辅酶I NAD (H) 含量检测试剂盒
- BC1030/BC1035 NAD 激酶 (NADK) 活性检测试剂盒
- BC0630/BC0635 NADH 氧化酶 (NOX) 活性检测试剂盒

