

## NADP-苹果酸酶（Malic enzyme, NADP-ME）试剂盒说明书

微量法 100 管/96 样

**注 意：** 正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 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  $\text{CO}_2$ ，以及伴随  $\text{NAD(P)}^+$  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  $\text{NAD-ME}(\text{EC}1.1.1.38)$  和  $\text{NADP-ME}(\text{EC}1.1.1.40)$ 。

### 测定原理：

$\text{NADP-ME}$  催化  $\text{NADP}^+$  还原成  $\text{NADPH}$ ，在 340nm 下测定  $\text{NADPH}$  增加速率。

### 需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板和蒸馏水。

### 试剂的组成和配制：

提取液：100mL×1 瓶，4℃ 保存。；

试剂一：液体 30mL×1 瓶，4℃ 保存；

试剂二：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存； 临用前加入 20mL 试剂一充分振荡，溶解待用，用不完的试剂分装后-20 度保存，禁止反复冻融。

试剂三：粉剂×1 瓶，-20℃ 保存；临用前加入 2.5mL 蒸馏水充分振荡，溶解待用，用不完的试剂分装后-20 度保存，禁止反复冻融。

### 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（ $10^4$  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）；14000g 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。14000g 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、在微量石英比色皿或 96 孔板中加入 10  $\mu\text{L}$  样本和 170  $\mu\text{L}$  试剂二，混匀，30℃ 孵育 5min，加入 20  $\mu\text{L}$  试剂三，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  $\Delta A=A_2-A_1$ 。

**NADP-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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \times \text{Cpr}) \div T = 3215 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 3215 \times \Delta A \div W$$

(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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V \text{ 样} \div V \text{ 样总}) \div T = 6.43 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V \text{ 样}) \div T = 6431 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times W) \div T = 6431 \times \Delta A \div W$$

(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 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V \text{ 反总} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V \text{ 样} \div V \text{ 样总} \times 500) \div T = 12.86 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$  L； $\epsilon$ ：NADPH 摩尔消光系数， $6.22 \times 10^3$  L / mol / cm；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，g；500：细菌或细胞总数，500 万。