NADP-苹果酸酶（Malic enzyme，NADP-ME）试剂盒说明书

微量法100管/96样

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CO_2，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)。

测定原理：

NADP-ME催化$NADP^+$还原成NADPH，在340nm下测定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°C保存。；

试剂一：液体30mL×1瓶，4°C保存；

试剂二：粉剂×1瓶，-20°C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°C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°C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°C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10μL样本和170μL试剂二，混匀，30°C孵育5min，加入20μL试剂三，混匀后立即记录340nm处初始吸光值A1和 1min后的吸光值A2，计算ΔA=A2-A1。

NADP-ME活性计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

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

NADP-ME（nmol/min/mg prot）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(V样×Cpr) ÷T= 3215×ΔA÷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。

NADP-ME（nmol/min/g 鲜重）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×109]÷(W× V样÷V样总) ÷T = 3215×ΔA÷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。

NADP-ME（nmol/min/10^4 cell）=[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V样÷V样总) ÷T =6.43×ΔA

V反总：反应体系总体积，$2×10^{-4}$ L；ε：NADPH摩尔消光系数，$6.22×10^3$ 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。

NADP-ME（nmol/min/mg prot）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(Cpr×V样) ÷T= 6431×ΔA÷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。

NADP-ME（nmol/min/g 鲜重）＝[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(V样÷V样总×W) ÷T = 6431×ΔA÷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。

NADP-ME（nmol/min/10^4 cell）=[ΔA×V反总÷（ε×d）×10^9]÷(V样÷V样总×500) ÷T =12.86×ΔA

V反总：反应体系总体积，$2×10^{-4}$ L；ε：NADPH摩尔消光系数，$6.22×10^3$ 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。