

NADP-苹果酸酶 (NADP-ME) 活性检测试剂盒 (紫外分光光度法)

产品货号: BA1220

产品规格: 50管/48样

产品简介:

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)。

NADP-ME催化NADP⁺还原成NADPH,在340nm下测定NADPH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。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。

产品内容:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体70mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体40mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	2-8℃
试剂三	粉剂×2支	2-8℃
试剂四	粉剂×2支	-20℃

溶液的配制:

1. 试剂二: 用时加入20mL提取液充分溶解备用;
2. 试剂三: 用时加入用时每支加1mL双蒸水充分溶解备用;
3. 试剂四: 用时每支加500μL双蒸水充分溶解备用;
4. 工作液: 在15mL试剂二中加入2mL试剂三和1mL试剂四,可以根据比例现用现配。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计、低温离心机、水浴锅、可调节移液器、1mL石英比色皿、研钵/匀浆器和蒸馏水。

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、细胞或组织样品的制备:

细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内,弃上清,按照每500万细菌或细胞加入1mL提取液,超声波破碎细菌或细胞(功率20%,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: 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)样品: 直接检测。

二、测定步骤:

1. 紫外分光光度计预热30min以上,调节波长至340nm,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。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

3. 操作表:

试剂名称 (μL)	测定管
试剂一	600
工作液	270
样本	30

将上述试剂按顺序加入1mL石英比色皿中混匀, 在37℃ (哺乳动物) 或25℃ (其它物种), 340nm波长下记录初始吸光度A1和反应1min后的吸光度A2, 计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。

三、NADP-ME活性计算:

1. 组织中NADP-ME活力的计算:

(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 NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 4823 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算:

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

$$\text{NADP-ME (U/g鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 4823 \times \Delta A \div W$$

2. 细菌或细胞中NADP-ME活力的计算:

(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1nmolNADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 4823 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 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 NADPH定义为一个酶活力单位。

$$\text{NADP-ME (U/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T = 9.65 \times \Delta A$$

3. 血清(浆)中NADP-ME活力的计算:

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

$$\text{NADP-ME (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 4823 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积, 9×10^{-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, 0.03mL; V样总: 加入提取液体积, 1mL; T: 反应时间, 1min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样品质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500万; 10^9 : 单位换算系数, 1mol= 10^9 nmol。

注意事项:

1. 若A2-A1大于0.5, 需将酶液用提取液稀释, 使A2-A1小于0.5, 可提高检测灵敏度。
2. 实验时, 试剂三、试剂四和样本在冰上放置, 以免变性和失活。试剂一37℃或25℃水浴放置。
3. 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。在反应过程中把比色皿连同反应液放在此烧杯中。
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。
5. 如果 $\Delta A < 0.01$, 可将反应时间延长5分钟或10分钟。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司
 Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com