

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	48T	微量法
AMHF7-M96		96T	

一、测定意义：

NAD-苹果酸酶（NAD-ME）的活性测定主要用于反映线粒体能量代谢与物质转化状态，通过催化苹果酸氧化脱羧参与肝、肾等组织的糖异生及脂肪酸合成前体供应，活性变化与肥胖、脂肪肝等代谢综合征的脂代谢紊乱密切相关，可作为评估机体能量稳态失衡的潜在指标。

二、测定原理：

NAD-苹果酸酶反应体系中预先加入的还原型辅酶 NADH 作为氢供体，参与苹果酸与丙酮酸的可逆转化过程，伴随自身氧化为 NAD⁺；由于 NADH 在 340nm 波长处具有特征性光吸收，而其氧化产物 NAD⁺在此波长下无显著吸收，因此通过实时监测 340nm 处吸光度的下降幅度，可直接反映 NADH 的消耗速率，进而定量表征 NAD-ME 的催化活性。

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
试剂三的配制： 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
试剂四的配制： 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

- 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。
- 细菌、细胞：按照细胞数量 10^4 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

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

试剂名称	测定管	空白管
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）

五、NAD-苹果酸酶（NAD-ME）酶活性计算：

- 按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟消耗 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

计算公式： $\text{NAD-ME (nmol/min/g)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div$

$$(V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T = 268 \times \Delta A \div W$$

2、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克蛋白每分钟消耗 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

计算公式： NAD-ME (nmol/min/mg) = $[\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 268 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$

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消耗 1nmol NADH 为一个酶活力单位。

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

V_{反总}: 反应体系总体积, 1×10⁻³ L; ε: NADH, 6.22×10³L/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; C_{pr}: 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。

六、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；
- 2、试剂三易受光、热及 pH 影响降解, 需分装避光冻存 (-20℃以下), 使用前快速解冻并现配现用；试剂四溶液需新鲜配制, 避免久置分解影响反应效率。

【厂家信息】

生产企业：南京陌凡生物科技有限公司

地址：南京市栖霞区红枫科技园 A6 栋 2 层

【售后微信】



【说明书核准及修改日期】

核准日期：2025 年 4 月 7 日

修改日期：2025 年 4 月 7 日